Gasheer-parasiet-assosiasies in die wêreldwye indringer *Xenopus laevis*

AL Schoeman



orcid.org/0000-0002-9096-5337

Proefskrif aanvaar ter nakoming vir die graad

Philosophiae Doctor in Wetenskap met Omgewingswetenskappe

aan die Noordwes-Universiteit

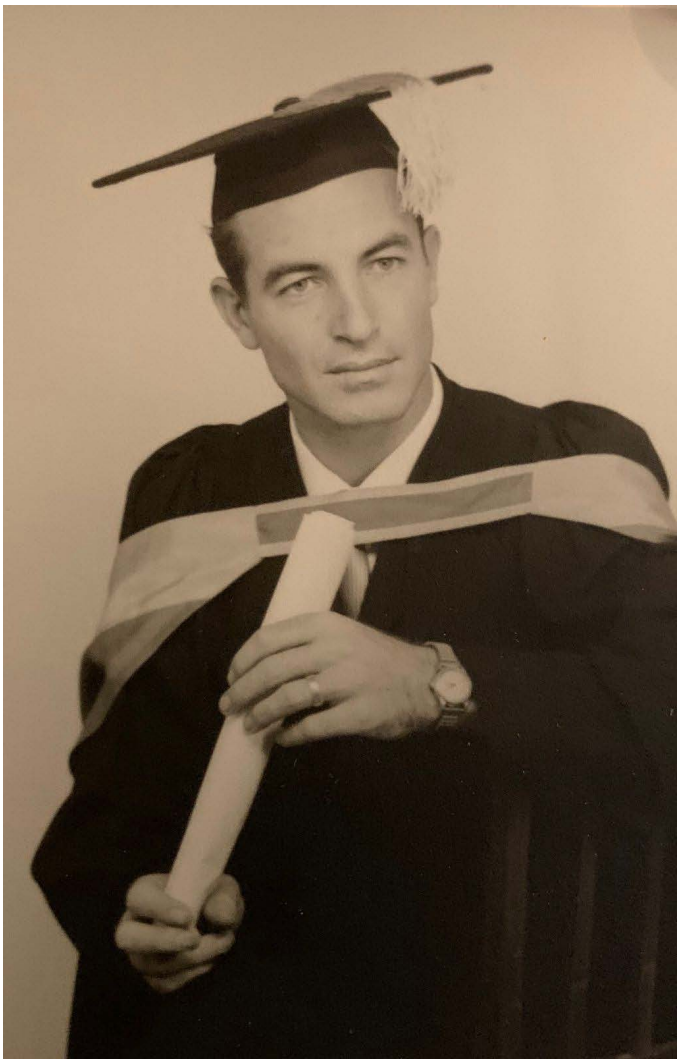
Promotor: Prof LH du Preez

Gradeplegtigheid Augustus 2021

29388325

In liefdevolle herinnering
aan my Oupa Thys

"Oupa se oudste
waaraan niemand iets kan doen nie"



Mathys Stephanus Louis Boshoff

30.iii.1937 tot 18.iii.2020

Verklaring

Hierdie proefskrif is in artikelformaat saamgestel en bestaan uit drie gepubliseerde navorsingsartikels (hoofstukke 2, 3 en 4) en drie ongepubliseerde manuskripte wat voorberei word vir indiening by akademiese joernale (hoofstukke 5, 6 en 7). Ek verklaar dat die proefskrif deur my opgestel is en dat die werk nie voorgelê is vir enige ander graad of professionele kwalifikasie nie. Ek bevestig dat die werk wat voorgelê word my eie is, behalwe waar werk wat deelvorm van gesamentlik geskrewe publikasies ingesluit is. Vir elkeen van hierdie manuskripte was ek hoofsaaklik vir studie-ontwerp, dataversameling, laboratoriumwerk, statistiese analises, skryfwerk, manuskripvoorbereiding en samestelling van mede-outeurs se hersienings verantwoordelik. Ek is die hoofouteur van hoofstukke 3–7. Afdelings waarby mede-outeurs leiding geneem het word onder aangedui. Alle mede-outeurs het hulle toestemming vir die voorlegging van die artikels en manuskripte vir graaddoeleindes gegee.

Hoofstuk 2 is in *Folia Parasitologica* gepubliseer (Svitin *et al.*, 2018) en is tesame met Roman Svitin en Louis H du Preez geskryf. Dr Svitin was die hoofouteur van hierdie publikasie. Hoofstuk 3 is in *African Zoology* gepubliseer (Schoeman *et al.*, 2020) en is tesame met Tracy-Lee Joubert, Louis H du Preez en Roman Svitin geskryf. Dr Svitin het sy kennis van nematologie tot hierdie manuskrip bygedra. Hoofstuk 4 is in *Biological Invasions* gepubliseer (Schoeman *et al.*, 2019) en is in samewerking met Natasha Kruger, Jean Secondi en Louis H du Preez geskryf. Hoofstuk 5 is in die voorbereidingsfase en sal ingedien word na die eksamineringsperiode. Louis H du Preez, Ané Jacobs, Giovanni Vimercati en Jean Secondi is betrokke as mede-outeurs. Hoofstuk 6 word voorberei vir beplande indiening by die *The Journal of Applied Ecology*. Nikol Kmentová, Louis H du Preez en Maarten PM Vanhove is betrokke as mede-outeurs. Hoofstuk 7 word voorberei vir indiening in *Genomics*. Nikol Kmentová, Louis H du Preez en Maarten PM Vanhove is betrokke as mede-outeurs.

Geen kopiereg is by die inhoud van enige van die manuskripte ter sprake nie. Die oorspronklike publikasies is geherformateer in ooreenstemming met die NWU se riglyne vir proefskrifvoorleggings.



Die Afrikaanse kopie van hierdie proefskrif is uit die Engels vertaal as ’n dankbetuiging vir die finansiële ondersteuning van die *Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns*. Stuur gerus ’n e-epos aan Anneke Lincoln Schoeman om die Engelse kopie te verkry. Meer inligting oor die vertalingsproses en -medewerkers en ’n volledige tweetalige termlys is aanlyn in Afrikaans of Engels beskikbaar.

Bedankings

As jy hierdie lees, beteken dit dat iewers op die mees suidelike punt van ’n moedige kontinent, ’n jonger weergawe van myself die gebruiklike paadjie van die evasgeslag verlaat het; pandemies en publikasiekopsere weerstaan het; paddas en pret opgeoffer het; die seën van gemeensaamheid en weetgierigheid ontdek het; en die eindelose genade van die Here intiem ervaar het: soos in my lewe, so ook in die pragtig geskape wêreld rondom my. Bowendien is hierdie dokument ’n bewys van honderde helpende hande.

Op hierdie reis is die allerkosbaarste die tyd wat ander sonder om te skroom gegee het om hierdie proefskrif tot stand te bring. Ek is dankbaar vir elke familielid, vriend, kollega en medemens wat ’n merk gelaat het op die afgelope vier jaar van my lewe. Ek koester julle tasbare insette en die emosionele, geestelike en intellektuele ondersteuning wat julle my gebied het. *Thank you*. *Baie dankie*. *Ke a leboga*. Дякую. *Merci*. *Dank je wel*. *Děkuji*. *Grazie*.

Op ’n soortgelyk opregte noot wil ek my dankbaarheid betuig aan die befondsingsliggame en instellings wat hierdie projek ’n werklikheid gemaak het. Die projek is hoofsaaklik deur ’n beurs vanaf die DSI-NRF Sentrum vir Uitnemendheid in Indringerbiologie befonds. Die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, asook die Noordwes-Universiteit, het persoonlike befondsing aan my verskaf. Ek is dankbaar teenoor die NWU se Taaldirektoraar wat nie net seker gemaak het dat ek ’n vaste inkomste as tolk van die voorgraadse dierkundeklasse verdien nie, maar ook buitengewoon tegemoetkomend was teenoor ’n PhD-student op die personeelskorps. Ek bied ook ’n spesiale woord van dank aan die liewe mense en uitstekende fasiliteite van die Eenheid vir Omgewingswetenskappe en -Bestuur by die Noordwes-Universiteit, die Sentrum vir Omgewingswetenskappe by UHasselt, die Fakulteit van Wetenskappe by die Université d’Angers en die Sentrum vir Indringerbiologie by die Stellenbosch Universiteit.

Laastens is ek Louis du Preez groot dank verskuldig. Liewe Prof, ek weet dat dit deel van Prof se werk is om PhD-studente te lei, maar Prof het die ekstra myl geloop om te verseker dat ek floreer, beide as wetenskaplike en as mens. Op Prof se goedhartige en beskeie wyse het die navorsingsgroep ’n familie en Potchefstroom ’n huis geword. Mag die pad vorentoe met God se seën en die lewe se wonders gevul word.

Opsomming

Die Antroposeen word gekenmerk deur spesies wat teen ’n ongeëwenaarde gang beweeg. Soos wat gebiede in reaksie op klimaatsverandering of as gevolg van menslike inmenging skuif, is dit noodsaaklik om die komplekse nuwe interaksies wat te voorskyn kom, te verstaan. Die huidige studie beveel aan dat ’n multidissiplinêre benadering tot indringerbiologie gevolg word, waar die toepassing van parasietdata uitdrukking vind. Ten einde hierdie doel te verwesenlik word die wêreld se mees wydverspreide padda *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae) en sy diverse metasoönparasietgemeenskap as ’n model vir die gasheer-parasiet-sisteem tydens gebiedsuitbreiding voorgestel.

As basis vir verdere navorsing in bio-indringing, is ”geïntegreerde taksonomie” toegepas om gapings in ons kennis van die verband tussen inheemse *X. laevis* en nematoodparasiete aan te spreek. Gevolglik is drie lede van die Camallanidae herbeskryf wat onontbeerlike molekulêre data gelewer het. Verder is nog sewe nematoodspesies wat met *X. laevis* verband hou vir die eerste keer bekend gemaak. Die parasietdinamiek wat hierdie opname aan die lig gebring het, beklemtoon die belang van DNA-staafkodes in indringerbiologie en die rol van *X. laevis* as ’n parasietreservoir. Verder word die oorsprong van die parasietspesies van *X. laevis* in die vreemde gebied toegelig.

As ’n volgende stap is die geografiese replikate van die parasitologiese opnames van *X. laevis* in sy inheemse suidelike Afrika en die uitheemse bevolkings in Frankryk, Portugal, Kalifornië en Chili as ’n ”natuurlike eksperiment” benut om oorkoepelende patrone in die gasheer-parasiet-dinamiek van indringerspesies uit te lig. Hierdie benadering bevestig die vyandsvrystellingshipotese vir hierdie wêreldwye indringeramfibie, maar by nadere ondersoek illustreer dit ook die komplekse parasietdinamiek van *X. laevis*-bevolkings in Suid-Afrika en westelike Frankryk. Die parasietgemeenskappe van die uitbreidende bevolkings van *X. laevis* word uitgeken aan hulle veranderlikheid in vergelyking met die gemeenskappe van gasheerbevolkings van ongerepte habitatte. Die uiteenlopende reaksies van parasiettaksa tot gebiedsuitbreiding toon aan dat verdere studie nodig is om die toekomstige gasheer-parasiet-vennootskappe te midde van ’n veranderende wêreld te voorspel.

Ten laaste is hierdie studie ’n konsepbewys dat parasietdata onafhanklike bewyse kan

lewer waarmee vraagstukke in indringerbiologie aangespreek kan word. Hierdie benadering is gebruik om die intraspesifieke kriptiese indringings van *X. leavis* met die hulp van ’n hoogs geassosieerde polistomatiedparasiet, *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae), in die inheemse gebied na te spoor. Die vergelykende filogeografie van die “holistiese eksemplare” het wydverspreide intraspesifieke indringingsgebeurtenisse van *X. laevis* regoor suidelike Afrika uitgeken, tot insigte gelei oor die oorsprong van die Franse uitheemse bevolking van die gasheer en selfs die rol van kleinskaalse antropogeniese verskuiwings van hierdie padda via die hengelarygemeenskap as rolspelers in verspreidingspatrone in die inheemse gebied geëien. As hulpbron vir toekomstige navorsers in die ontwikkeling van mitochondriese merkers tydens die gebruik van polistomatiede as aanwysers van gasheerfilogeografie, is die volledige mitochondriese genoom van *P. xenopodis* gekarakteriseer. Intraspesifieke vergelykings van die mitogenoom van hierdie polistomatied het belowende geenstreke vir filogeografiese analises geïdentifiseer.

Oplaas is daar aangetoon dat ’n multidissiplinêre benadering, wat beide gasheer- en parasietdata betrek, groot potensiaal in indringerbiologie inhou. Hierdie studie demonstreer die benadering aan die hand van ’n welbestudeerde model van ’n gasheer-parasietsisteem.

Sleutelterme: Antroposeen; Biologiese indringing; Gebiedsuitbreiding; Geïntegreerde taksonomie; Ko-filogeografie; Kriptiese indringing; Meersellige parasiete; Mitogenomika; Multidissiplinêr; Natuurlike eksperiment.

Abstract

In the Anthropocene, the movement of species takes place at unprecedented rates. As ranges shift in reaction to climate change or through human mediation, we need to understand the complex novel interactions that arise. In the present study, a multidisciplinary approach to invasion biology, exemplifying the application of parasite data, is advanced. To this end, the world's most widespread frog, *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae), and its diverse assemblage of metazoan parasites are proposed as a model host-parasite system during range expansion.

As a baseline for further bio-invasion investigations, ïntegrative taxonomy"was applied to address knowledge gaps regarding the associations between native *X. laevis* and nematode parasites. Thus followed the redescription of three members of the Camallanidae, providing indispensable molecular data, as well as the first report of seven more nematode species that are associated with *X. laevis*. The parasite dynamics revealed in this survey highlights the need for the inclusion of DNA barcodes, emphasises the role of *X. laevis* as a parasite reservoir and provides insight on the origin of the parasite species of *X. laevis* in the invasive range.

As a next step, the geographic replicates of parasitological surveys of *X. laevis* in its native southern Africa and the invasive populations in France, Portugal, California and Chile, acted as a "natural experiment"to identify over-arching patterns in the host-parasite dynamics of invasive species. This approach demonstrates the Enemy Release Hypothesis for this globally invasive amphibian host yet also reveals complex parasite dynamics of *X. laevis* populations in South Africa and western France upon closer inspection. The parasite communities of expanding populations of *X. laevis* are typified as more variable than the communities from host populations from natural habitats. The divergent responses of parasite taxa to range expansion show that these systems merit further study to predict the future of host-parasite associations amidst global change.

Finally, this study proves the concept that parasite data sets can provide an independent line of evidence to address questions in invasion biology. This approach was applied to trace the intraspecific cryptic invasions of *X. leavis* in its native range with the help of its highly associated polystomatid parasite, *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943)

Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae). The comparative phylogeography of these ”holistic specimens”revealed widespread lineage-level invasion events of *X. laevis* across southern Africa, provided insight on the origin of the French invasive population of the host and even revealed the role of small-scale human-mediated translocation of this frog via the recreational fishing community in shaping its dispersal patterns in the native range. In order to aid future investigators in the development of mitochondrial markers when using polystomatid parasites as tags for host phylogeography, the complete mitochondrial genome of *P. xenopodis* was sequenced and annotated. Intraspecific comparison of the mitogenome sequences of this polystomatid identified promising gene regions for phylogeographic analyses.

Ultimately, a multidisciplinary approach that incorporates both host and parasite data holds great potential in invasion biology. This study demonstrates this approach via the lens of a well-studied model host-parasite system.

Keywords: Anthropocene; Biological invasion; Co-phylogeography; Cryptic invasion; Integrative taxonomy; Metazoan parasite; Mitogenomics; Multidisciplinary; Natural experiment; Range expansion.

Inhoud

1 Inleiding tot ’n parasiettaxi **1**

1.1 Biologiese indringing, ’n teken van die tyd 1

1.2 Parasiete, die tersluikse passasiers van gebiedsuitbreiding 2

1.3 Model-gasheer-parasiet-sisteme word in indringerbiologie vereis 2

1.4 ’n Wêreldwye indringerpadda en sy parasiete as model 3

1.5 Doel: Toepassing van die padda-parasiet-model op kwessies in indringerbiologie 4

1.5.1 Doelstelling 1: Die aanwending van geïntegreerde taksonomie om kennis oor natuurlike parasietassosiasies uit te brei 5

1.5.2 Doelstelling 2: Analise van parasietinfra- en komponentgemeenskappe om parasietdinamiek tussen die natuurlike en vreemde gebiede te vergelyk 6

1.5.3 Doelstelling 3: Vergelykende biogeografie as ’n meer holistiese benadering tot die naspeuring van indringers 7

1.6 Metodologiese betragtings 8

1.6.1 Parasitologiese opnames 8

1.6.2 Etiese oorwegings 8

1.6.3 Ontwerp van monsterneming 9

2 Taksonomiese opdatering van inheemse nematode **10**

2.1 Inleiding 10

2.2 Metodes 12
2.3 Resultate 14
2.3.1 Morfologiese beskrywings 14
2.3.2 Molekulêre analise 22
2.4 Bespreking 23

3 Nuwe meldings van inheemse nematode **26**
3.1 Inleiding 26
3.2 Metodes 28
3.3 Resultate 30
3.3.1 Nematoodbeskrywings 30
3.3.2 Rol van *Xenopus laevis* in die oordrag van nematoodspesies 42
3.4 Bespreking 43

4 Herhaaldelike parasietverlies in die vreemde gebied **47**
4.1 Inleiding 47
4.2 Metodes 49
4.2.1 Gasheer- en parasietversameling in Frankryk 49
4.2.2 Parasiet-uitkenning in die Franse bevolking 51
4.2.3 Gasheer- en parasietversameling in Suid-Afrika 51
4.2.4 Parasiet-uitkenning in Suid-Afrika 52
4.2.5 Parasitologiese opnames van die literatuur en verduideliking van parasitologiese parameters 52
4.2.6 Statistiese analises 53
4.3 Resultate 55
4.3.1 Parasitologiiese opnames in Frankryk en Suid-Afrika 55

4.3.2 Effek van monsternemingspoging 57
4.3.3 Parasitisme van gashere in die natuurlike en vreemde gebiede . . . 57
4.3.4 Eienskappe van begeleidende parasiete 58
4.3.5 Vatbaarheid van indringergashere vir parasitisme 59
4.3.6 Ongelyksoortigheidsanalises van die parasietgemeenskappe 59
4.4 Bespreking 60

5 Komplekse parasietdinamiek in gebiedsuitbreiding **65**

5.1 Inleiding 65
5.2 Metodes 68
5.2.1 Gasheerversameling 68
5.2.2 Parasietversameling en -identifikasie 68
5.2.3 Berekening van geskaleerde massaïndeks 70
5.2.4 Habitatklassifikasie in die natuurlike gebied 71
5.2.5 Berekening van weë van die geringste koste vanaf invoerpunt in die vreemde gebied 72
5.2.6 Kwantifisering van parasitisme 72
5.2.7 Seleksie van voorspellers 73
5.2.8 Statistiese analises 74
5.3 Resultate 76
5.3.1 Parasietversamelings van *X. laevis* in die natuurlike en vreemde gebiede 76
5.3.2 Intrinsieke en ekstrinsieke faktore wat parasitisme in die natuurlike gebied beïnvloed 77
5.3.3 Invloed van gebiedsuitbreiding op parasitisme in die vreemde gebied 79
5.4 Bespreking 80

5.4.1 Gasheerliggaamsgrootte het ietwat van ’n invloed op verdringing en lintwurmveelheid, maar nie monogeneërveelheid nie, by inheemse *Xenopus laevis* . . . 81

5.4.2 Ekstrinsieke faktore speel die grootste rol in die vorming van parasitisme van inheemse *Xenopus laevis* . . . 83

5.4.3 Lintwurmveelheid neem af met afstand vanaf die invoerligging in uitheemse *Xenopus laevis* . . . 85

5.4.4 Implikasies vir die plaaslike en wêreldwye indringing van gasheer-parasiet-sisteme . . . 87

6 Parasiete ontbloot die invoering van gashere **89**

6.1 Inleiding . . . 89

6.2 Metodes . . . 92

6.2.1 Gasheer- en parasietmonsterneming . . . 92

6.2.2 Molekulêre dataversameling . . . 94

6.2.3 Haplotiepnetwerk . . . 95

6.2.4 Filogenetiese analises . . . 95

6.2.5 Kofilogenetiese analises . . . 97

6.3 Resultate . . . 98

6.3.1 Volgordeverskeidenheid . . . 98

6.3.2 Gasheer en parasiet se filogeografiese trosvorming . . . 98

6.3.3 Gasheer- en parasietfilogenie en kongruensie . . . 101

6.4 Bespreking . . . 103

6.4.1 Parasiettrosvorming weerspieël die intraspesifieke filogeografie van die gasheer . . . 104

6.4.2 Parasietoorspoel is ’n aanduiding van kontak tussen divergente gasheerstamlyne . . . 104

6.4.3 Parasietfilogeografie is ’n onontginde hulpmiddel in indringerbiologie 106

6.4.4 Gevolgtrekking en aanbevelings 108

7 Monogeneërmitogenoom vir indringergenomika 109

7.1 Inleiding 109

7.2 Metodes 112

7.3 Resultate 117

7.3.1 Volgordebepaling en montering 117

7.3.2 Annotasie 118

7.3.3 Mitogenoomargitektuur, geeninhoud en intraspesifieke variasie . . . 122

7.3.4 Vergelyking met ander poliopistokotileërmitogenome 128

7.3.5 Mitogenoomfilogenie 129

7.4 Bespreking 130

8 Oorsig en vooruitsigte 138

8.1 Die rol van geïntegreerde taksonomie in indringerbiologie 139

8.2 Uitmaak van patrone in indringerbiologie met wêreldwye replikate van koïngevoerde gasheer-parasiet-sisteme 141

8.3 Parasiete as aanvullende bewysstukke in bio-indringernavorsing 142

8.4 ’n Toekomsblik op indringerbiologie vanuit die standpunt van ’n parasitoloog 143

A Inligting oor vindoorde 190

B Bykomende morfometriek van ’n polistomatied 195

B.1 Agtergrond en doel 195

B.2 Morphometriek 196

B.3 Statistiese analises 196

B.4 Beduidende morfologiese variasie tussen Suid-Afrikaanse *Protopolystoma xenopodis* 197

B.5 Implikasies 199

Figgurelys

2.1 *Batrachocamallanus slomei* Southwell *et* Kirshner, 1937 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mikrofoto's. 15

2.2 *Camallanus kaapstaadi* Southwell *et* Kirshner, 1937 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mikrofoto's. 17

2.3 *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mikrofoto's. 20

2.4 *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mannetjie, lynsketse. 21

2.5 Filogenetiese boom van sewe spesies van *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915, gebaseer op gedeeltelike *28S*-volgordes. 22

2.6 Filogenetiese boom van vier spesies van *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915, gebaseer op gedeeltelike *COX1*-volgordes. 23

3.1 Verspreiding van sewe voorheen onbeskryfde nematoodspesies wat by tien liggings regoor Suid-Afrika gevind is gedurende die parasitologiese sifting van *Xenopus laevis*. 31

3.2 Volwasse wyfie van *Capillaria* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 33

3.3 Derdestadiumlarf van *Contracaecum* sp. geënsisteerd in *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 34

3.4 Volwasse *Falcaustra* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 36

3.5 Derdestadiumlarf van *Paraquimperia* sp. vanaf die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 38

3.6 Derdestadiumlarf van *Tanqua* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 40

3.7 Onuitgekende tweedestadiumnematoodlarwe sp. 1 & 2 vanuit die longe, lewer en niere van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. 41

3.8 Voorgestelde trofiese transmissie in 'n varswaterekosisteem van sewe nematoodparasiete wat met *Xenopus laevis* geassosieer word. 43

4.1 Parasietspesierykheid by 47 liggings waar volledige parasitologiese opnames van *Xenopus laevis* uitgevoer is. 50

4.2 Metasoönparasietspesierykheid van bevolkings van *Xenopus laevis* is laer in die vreemde gebied as in die natuurlike gebied. 58

4.3 Per-ligging-voorkomsyfer van 'n monogeneërparasiet van *Xenopus laevis* is hoër in die natuurlike gebied as die vreemde gebied, maar is nie beduidend verskillend in die geval van 'n sestoodparasiet nie. 60

4.4 Niemetriese multidimensionele skalering van samestellingsongelyksoortigheid onthul dat die metasoönparasietgemeenskappe van natuurlike (suidelike Afrika) en indringerbevolkings (Kalifornië, Chili, Frankryk en Portugal) van *Xenopus laevis* aparte trosse vorm as gevolg van verlies aan vyande in indringergashere. 61

5.1 Verspreiding van vindoorde in westelike Frankryk en Suid-Afrika waar volwasse *Xenopus laevis* tesame met hulle metasoönparasietversamelings bymekaargemaak is. 69

5.2 Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste en stogastiese effekte van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in Suid-Afrika as respons. 78

5.2 Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste en stogastiese effekte van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in Suid-Afrika as respons (*vervolg*). 79

5.3 Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste en stogastiese effekte van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in westelike Frankryk as respons. 81

6.1 Vindoorde in suidelike Afrika waar 46 volwasse *Xenopus laevis* saam met die platwurmparasiet *Protopolystoma xenopodis* versamel is. 93

6.2 Mediaanspanhaplotiepnetwerk van die aaneengeskakelde gedeeltelike *COX1* en *rrnS* gene van 59 eksemplare van *Xenopus laevis* en hulle ooreenstemmende 59 *Protopolystoma xenopodis*-parasiete van hulle natuurlike en vreemde gebiede. 99

6.3 Die interaksienetwerk en maksimumwaarskynlikheidsfilogenieë van die padda *Xenopus laevis* en sy polystomatied *Protopolystoma xenopodis*. . . 102

7.1 Mitochondriese genoom van die polistomatiedplatwurm *Protopolystoma xenopodis*. 118

7.2 Voorspelde sekondêre strukture van die oordraer-RNA's wat deur die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis* gekodeer word. 125

7.2 Voorspelde sekondêre strukture van die oordraer-RNA's wat deur die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis* gekodeer word (*vervolg*). 126

7.3 Nukeotiedverskeidenheid (π) tussen die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis*. 128

7.4 Geenorderangskikkingscenarios tussen nege poliopistokotileërmitogenome, gebaseer op die paarsgewyse vergelyking van sewe volledige mitogenome met die nuut geannoteerde volgordes van *Propopolystoma xenopodis*. . . . 130

7.5 Meerderheidsbeginselkonsensusboom vanaf die Bayes-inferensie (BI) van filogenie van 14 mitochondriese gene van 12 poliopistokotileërspesies. . . . 132

B.1 Hoofkomponentanalise van die morfologiese eienskappe van *Protopolystoma xenopodis* van twee filogeografiese stamlyne van die gasheer *Xenopus laevis*. 198

Tabellelys

2.1 Geografiese oorsprong, habitat en infeksievlakke van drie nematode vanaf 97 *Xenopus laevis* (Daudin) van 11 vindoorde in Suid-Afrika. 13

3.1 Volledige vindoord- en infeksiedata, volgens Bush *et al.* (1997), van die sewe nematoodspesies wat vir die eerste keer vanaf die gewone platanna *Xenopus laevis*, afkomstig van tien vindoorde in Suid-Afrika, opgeteken is. . 32

4.1 Verspreiding en infeksievlakke van die twee parasiete van *Xenopus laevis* vanaf die vreemde gebied in westelike Frankryk. 56

5.1 Bayes-R^2-waardes van die ses veralgemeende lineêre gemengde modelle waar infragemeenskapsverdringing en die veelheid van *Cephalochlamys namaquensis* en *Protopolystoma xenopodis* in beide die natuurlike en vreemde gebiede teenoor intrinsieke en ektrinsieke faktore gemodelleer is. 80

6.1 Voorvoorders wat die DNA-amplifikasie en -volgordebepaling van die *COX1*- en *rrnS*-gene van *Xenopus laevis* en *Protopolystoma xenopodis* aangewend is. 94

7.1 Poliopistokotileërspesies met beskikbare mitochondriese genome. 114

7.2 Beste opdelingskema vir die aaneengeskakelde belyning van 14 mitochondriese gene vanaf 14 monogeneërplatwurmspesies. 116

7.3 GC-inhoud en samestellingsasimmetrie in die twee nuutmonteerde mitogenoomvolgordes van *Protopolystoma xenopodis* en die hergeannoteerde konsepmitogenoom van *Diplorchis hangzhouensis*. 119

7.4 Plasing van die gene en niekoderende gebiede in die mitochondriese genoom van *Protopolystoma xenopodis*. 120

7.5 Voorgestelde veranderinge aan die geenposisie, lengte en inisiasie-, stop en antikodons in sekere van die poliopistokotileërmitogenome wat op GenBank beskikbaar is. 121

7.6 Kodonfrekwensies in die proteïenkoderende gene van *Protopolystoma xenopodis*. 124

7.7 Vergelyking van die algemene eienskappe van al die voorheen gepubliseerde, volledige mitochondriese genome van poliopistokotileërs met die nuut geannoteerde mitogenoomvolgordes van *Protopolystoma xenopodis*. . 131

A.1 Breedvoerige inligting oor die vindoorde op vier kontinente waar *Xenopus laevis*-eksemplare vir parasitologiese opnames versamel is. 191

Afkortingstabel

aa	Aminosuur
ATP6	Geen vir ATP syntase F0 subeenheid 6
bp	Nukleotiedbasispare
COX1–3	Gene vir subeenhede I–III van sitochroom *c* oksidase
cytb	Geen vir sitochroom *b*
F	Empiriese basisfrekwensie
G	Diskrete Gamma-model (Yang, 1994)
GTR	Algemene tydsomkeerbare DNA-model van evolusie (Tavaré, 1986)
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano-DNA-model van evolusie (Hasegawa *et al.*, 1985)
I	Toelating vir 'n breuk van invariante liggings (Gu *et al.*, 1995)
ITS	Tussengetranskribeerde skeiergeenstreek
mitogenoom	Mitochondriese genoom
***NAD1–6*; NAD4L**	Gene vir subeenhede 1–6 en 4L van NADH dehidrogenase
NGS	Volgende-generasie-volgordebepaling
PCR	Polymerasekettingreaksie
R	FreeRate-model (Soubrier *et al.*, 2012)
rRNA	Ribosomale RNA
rrnL*; *rrnS	Gene vir die groot (16S) en klein (12S) subeenhede van ribosomale RNA
SD	Standaardafwyking
TIM	Transisionele DNA-model van evolusie (Posada, 2003)
tRNA	Oordraer-RNA
trnX	Gene wat kodeer vir oordraer-RNA-molekules met die oorenstemmende aminosure aangedui deur die eenletterkod
TPM	3-parameter-DNA-model van evolusie (Kimura, 1981)



Hoofstuk 1

Inleiding tot *Xenopus laevis*, ’n parasiettaxi te midde van aardverandering

1.1 Biologiese indringing, ’n teken van die tyd

Die jaar 2020 was ’n les oor die onstuitbare skade wat deur die verspreiding van organismes aangerig kan word (Morens *et al.*, 2020). In eg persoonlike, tog universele maniere is ons almal deur die feit gekonfronteer dat ons toenemend in ’n wêreld wat deur die beweging van spesies en hulle geassosieerde parasiete en patogene gekenmerk word, gaan leef (Chinchio *et al.*, 2020). Die werklikheid van vêrreikende, mensbemiddelde biologiese indringing wat die wêreld onherroeplik verander, is inderdaad een van die stempels van die Antroposeen (Bar-On *et al.*, 2018; Blackburn *et al.*, 2019; Capinha *et al.*, 2015; Ellis *et al.*, 2012; Ricciardi, 2007).

Biologiese indringing is die ontheemding van organismes na streke buite hulle natuurlike gebiede waar nuwe bevolkings vestig en uitbrei (Blackburn *et al.*, 2011). Alhoewel die uitwerkings van indringergebeurtenisse nie noodwendig altyd nadelig is nie, word dit algemeen aanvaar dat indringers oor die vermoë beskik om hulle vreemde habitatte in nouliks merkbare, tog ingrypende maniere van gedaante te laat verwissel (Simberloff, 2011). Dit is veral die verspreiding van hoogs mededingende generalisindringerspesies wat die afname in biodiversiteit in hulle nuwe omgewings dryf (Bellard *et al.*, 2016; Ricciardi, 2007). ’n Toepaslike voorbeeld hiervan is die blywende letsel van indringers wat gemerk kan word in hulle rol as dryfveer van omtrent ’n derde van spesie-uitsterwings sedert die sestiende eeu (Blackburn *et al.*, 2019).

1.2 Parasiete, die tersluikse passasiers van gebiedsuitbreiding

Daar waar vrylewende spesies gaan, volg hulle parasiete. Vir elke suksesvolle biologiese indringer bestaan daar 'n beraamde drie koïngevoerde parasiete (Torchin *et al.*, 2003). Net soos hulle gashere beskik uitheemse parasiete oor die vermoë om hulle nuwe habitatte te verander, selfs al is hulle nie een van die sleuteloorsake van hulle gasheer se sukses as indringer nie (Blackburn & Ewen, 2017). Op 'n indirekte wyse kan die subtiele wysigings van spesiesinteraksies wat deur biologiese indringers meegebring word en wat deur hulle geassosiaseerde parasiete tot 'n spits gedryf word, op die lange duur tot dramatiese ekosisteemwye veranderinge lei (Amundsen *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2012; Roy & Lawson Handley, 2012). In die besonder bedreig die beweging van simbionte saam met hulle gashere na nuwe geografiese gebiede die welsyn van mens en dier deur die verskyning van nuwe interaksies (Chinchio *et al.*, 2020; Daszak, 2000).

Hoe dit ook al sy, die deurdringende nadraai van parasiete as deelnemers aan indringing word nie deur 'n gelyke aandeel aan navorsing op die wysiging van parasietdinamiek gedurende gasheergebiedsuitbreiding onderskraag nie (Blackburn & Ewen, 2017). Desweë bly ons verstaan van die aard van moontlike nuwe gasheer-parasiet-interaksies en die algehele verandering van die fyn dinamiek wat vanweë biologiese indringing verrys, beperk.

1.3 Model-gasheer-parasiet-sisteme word in indringerbiologie vereis

Biologiese indringing, alhoewel dit rampspoedige gevolge kan hê, voorsien ons van die unieke geleentheid om hipoteses in ekologie en evolusie te toets, danksy die grootskaalse, geografies gerepliseerde ekosisteemmanipulasie wat daarmee gepaard gaan (Blackburn, 2008; Morand *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2011a). Die wetenskaplike wêreld kan baie leer vanaf die ontwrigting van oeroue interaksies en die totstandkoming van nuwe assosiasies wat die gebiedsuitbreiding van spesies karakteriseer, veral soos ons ons voorberei op onvermydelike aardverandering. Desnieteenstaande is daar baie onbekendes ten opsigte van die tendense wat indringing stut, net soos met enige ander natuurlike proses (Crystal-Ornelas & Lockwood, 2020), veral as ons die bykomende ingewikkeldheid van ko-ingevoerde parasiete in ag neem (Blackburn & Ewen, 2017). Hierdie kennisskaarste mag ons vermoë beperk om die faktore wat die verrassende dinamiek van indringer-gasheer-parasiet-sisteme vorm, te bestudeer.

Die gebruik van welbestudeerde modelsisteme kan van onskatbare waarde wees om hipoteses en patrone in indringerbiologie te ontdek, juis omdat daar minder onbekendes is om mee te stoei (Gundale *et al.*, 2014). Volgens Gundale *et al.* (2014) kan so 'n

modelsisteem uiters waardevol wees as dit oor drie eienskappe beskik. Eerstens moet die invoering van die spesies na 'n wye verskeidenheid van liggings deeglik opgeteken wees. Tweedens is die groeivorm van die spesie veronderstel om opvallend en bestudeerbaar wees. Derdens sal kennis oor propaguuldruk, genetiese samestelling en die biotiese en abiotiese faktore wat in die uitheemse gebied 'n rol speel, 'n bonus wees. Met inagneming van die verwaarloosde studie van gasheer-parasiet-verhoudinge tydens indringing, kan ons 'n vierde kriterium byvoeg. 'n Wye kennis van die geassosieerde parasiete van die spesie in beide die natuurlike en vreemde gebied sal indringerbioloë grootliks bystaan om simbionte deel van hulle studies te maak.

1.4 'n Wêreldwye indringerpadda en sy parasiete as model

Op grond hiervan is die wêreldwye indringerpadda *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae) en sy geassosieerde parasietversamelings 'n aantreklike kandidaat om die gedrag van gasheer-parasiet-sisteme tydens indringing te ontdek.

Die gasheerspesie is geen vreemdeling in die wêreld van dieremodelle vir navorsing nie (Gurdon & Hopwood, 2000). Om die waarheid te sê, hierdie is juis die rede vir sy vinnige uitbreiding vanaf sy natuurlike suidelike Afrika tot sy huidige byna wêreldwye verspreiding (Measey *et al.*, 2012). Hierdie gebiedsuitbreiding het in die 1930's begin na aanleiding van sy gebruik as a swangerskapstoets (Shapiro & Zwarenstein, 1934). Kragtens sy geharde aard en gemak van aanhouding, is dit geredelik as 'n gewerwelde diermodel in navorsing aangeneem, veral in ontwikkelingsbiologie (Gurdon & Hopwood, 2000). Deesdae is die troeteldierhandel die grootste sondebok in die verspreiding van *X. laevis* (bv Wang *et al.*, 2019).

Soos dit nou daar uitsien, spog *X. laevis* met indringerbevolkings op vier kontinente buite Afrika, wat menige onafhanklike indringerroetes en redelik welbestudeerde invoerings verteenwoordig (saamgevat in Measey *et al.*, 2012). Sommige indringerbevolkings, soos dié in die Verenigde Koninkryk, het intussen in duie gestort (Tinsley *et al.*, 2015). Ander is suksesvol uitgeroei (Measey *et al.*, 2012). Nog ander verteenwoordig uitheemse bevolkings met beperkte uitbreidingskapasiteit (Hill *et al.*, 2017; Measey *et al.*, 2012). In weerwil daarvan brei die oorgrote meerderheid van hierdie indringerbevolkings teen 'n hoë koers uit na ongerealiseerde nisgebiede wat al hoe toegankliker raak as gevolg van klimaatsverandering (Ihlow *et al.*, 2016; Measey *et al.*, 2012; Rödder *et al.*, 2017; Vimercati *et al.*, 2020).

Binne sy natuurlike gebied in suidelike Afrika het die genetiese uiteenloping van *X. laevis* die aandag van 'n aantal ondersoekers getrek (du Preez *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2015; Grohovaz *et al.*, 1996; Measey & Channing, 2003; Measey, 2004). Voortspruitend uit die kennis van die genetiese samestelling van die natuurlike bevolkings van *X. laevis*,

was dit vir ondersoekers moontlik om min of meer die geografiese oorsprong van verskeie indringerbevolkings van *X. laevis* te bepaal (de Busschere *et al.*, 2016; Lillo *et al.*, 2013; Lobos *et al.*, 2014). Na dese is die genetiese samestelling van 'n aantal van die indringerbevolkings aan die lig gebring.

Ons beskik oor breedvoerige aantekeninge van die amptelike uitvoerroetes van *X. laevis* (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Tesame met honderde besendings vanaf die Kaapstad-area en omliggende gebiede na die wêreldmark, het die plaaslike mark die merendeel van die geskiedkundige handel van *X. laevis* in beslag geneem (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Hierdie wydverspreide mensbemiddelde verplasings van *X. laevis* in sy natuurlike gebied vat hande met natuurlike oorlandse en akwatiese verspreidingsnetwerke, wat *X. laevis* die reputasie as plaaslike eksoot laat opbou het (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2004, 2016; Measey *et al.*, 2012).

Oor die geheel is *X. laevis* stellig die wêreld se mees wydverspreide en welbestudeerde amfibie (Measey *et al.*, 2012; van Sittert & Measey, 2016). Dit is duidelik dat heelwat aspekte van sy indringergeskiedenis breedweg bekend is. Op die koop toe maak hierdie indringer se ongelooflike ryk en grondig bestudeerde parasietfauna, met meer as 25 geassosieerde parasitiese genera in die natuurlike gebied, dié spesie besonder waardevol vir die studie van parasietdinamiek gedurende indringing (sien parasietopnames in Cosgrove & Jared, 1974; Macnae *et al.*, 1973; Pritchard, 1964; Southwell & Kirshner, 1937; Thurston, 1970; Tinsley, 1996; Vercammen-Grandjean, 1960). Daar is selfs 'n aantal parasietmeldings en -opnames van indringerbevolkings van *X. laevis* (Castillo *et al.*, 2017; Jackson & Tinsley, 2001a; Kuperman *et al.*, 2004; Lafferty & Page, 1997; Rodrigues, 2014; Tinsley & Jackson, 1998b). Hierdie opnames het aangetoon dat *X. laevis* en sy simbionte onafskeidbaar is waar gebiedsuitbreiding ter sprake is. Daarom is dit klinkklaar dat ons met *X. laevis* en sy parasiete 'n intiem geassosieerde en wydsverspreide gasheer-parasiet-sisteem tot ons beskikking het wat uiters belowend is om meer inligting oor algemene tendense in indringerbiologie te verkry.

1.5 Doel: Toepassing van die padda-parasiet-model op kwessies in indringerbiologie

Vervolgens stel hierdie studie 'n multidissiplinêre benadering ten toon om die waarde van 'n wêreldwyd verspreide gasheer-parasiet-sisteem te toets met die oogmerk om ou vrae in ïndringerparasitologie-- daardie onderontdekte subdissipline van indringerekologie wat begaan is met die mees algemene lewenstyl onder uitheemse spesies – aan te pak (Blackburn & Ewen, 2017).

1.5.1 Doelstelling 1: Die aanwending van geïntegreerde taksonomie om kennis oor natuurlike parasietassosiasies uit te brei

In hulle oorsig van *X. laevis* se voortslepende wêreldwye indringing waarsku Measey *et al.* (2012) dat "comparatively few reports exist of *X. laevis* in its natural habitat, and we continue to be ignorant of the native ecology and natural dispersal of this globally invasive species". Uiteraard is hierdie gaping in ons kennis nadelig vir die bestuur van *X. laevis* sy indringergebied. Eweneens sal 'n parasitoloog aanvoer dat hierdie onkunde verskeie aspekte van die natuulike parasietekologie insluit, die mees belangrike waarvan seker betroubare spesie-uitkennings, gebaseer op beide morfologiese en molekulêre data, is. Die ontwikkeling van nuwe tegnieke in gevorderde mikroskopie en DNA-staafkodering het die weg vir 'n geïntegreerde benadering tot parasitologie gebaan (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Uit die oogpunt van indringerbiologie, lê die korrekte klassifikasie van spesies die fondasie vir toekomstige navorsing oor bio-indringing en mog dit derhalwe nie verwaarloos word nie (Mazzamuto *et al.*, 2016).

In die huidige studie lê die eerste twee hoofstukke (2 en 3) hulle op 'n meervoudige benadering tot die taksonomie van beide voorheen opgetekende en onopgetekende parasietspesies van *X. laevis* in sy natuurlike gebied toe. In hierdie geval is die fokus van die ondersoek die Nematoda, die tweede mees spesieryke takson onder die parasietgroepe van *X. laevis* (oorsig in Tinsley, 1996). Onder die dekmantel van hierdie poging is die beskikbare inligting oor drie spesies van die Camallanidae van *X. laevis* regoor Suid-Afrika bygewerk in terme van infeksievlakke, vindoordinligting, gewysigde morfologiese beskrywings en molekulêre data (Hoofstuk 2, hierna bekend as Svitin *et al.*, 2018).

Parasitologiese opnames van *X. laevis* in die indringergebied het uitgewys dat nuwe parasietassosiasies in hierdie gebiede mees waarskynlik met nematoodlarwe vanaf die inheemse parasietversamelings van die nuwe omgewing plaasvind (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004). Net so is daar melding van interaksies tussen *X. laevis* en onuitgekende nematode in die natuurlike gebied (Brayton, 1992; Cosgrove & Jared, 1974; Thurston, 1970), wat die moontlikheid van *X. laevis* as parateniese of tussengasheer in parasietsiklussering voorstel. Met hierdie doel voor oë word sewe voorheen onopgetekende nematoodspesies wat hierdie gasheer in Suid-Afrika parasiteer, aangemeld, 'n verstommende aantal verwaarloosde parasietassosiasies vir so 'n welbestudeerde gasheer-parasiet-sisteem (Hoofstuk 3, hierna bekend as Schoeman *et al.*, 2020). In die gees van die pluralistiese benadering van geïntegreerde taksonomie is bondige morfologiese beskrywings gebaseer op gevorderde mikroskopie, tesame met molekulêre data en verspreidingsinligting, beskikbaar gemaak. Origens is moontlike weë van parasietoordrag verken, gebaseer op 'n literatuurstudie, om die rol van inheemse *X. laevis* in parasietsiklussering in die natuurlike gebied toe te lig.

1.5.2 Doelstelling 2: Analise van parasietinfra- en komponentgemeenskappe om parasietdinamiek tussen die natuurlike en vreemde gebiede te vergelyk

Die groot sterkpunt van vergelykende biogeografie in die lig van biologiese indringing is die bestaan van onafhanklike geografiese replikate van dieselfde sisteem (Blackburn, 2008). Tog is die ramifikasies van 'n enkele indringerspesie oor verskeie ekosisteme slegs in uitsonderlike gevalle nagevors (Crystal-Ornelas & Lockwood, 2020) en dit is des te meer waar vir ondersoeke van bio-indringing wat parasiete insluit (Blackburn & Ewen, 2017). Betreklik min studies het byvoorbeeld die Vyandvrystellingshipotese (ERH) oor verskeie geografiese replikate van wêreldwyd verspreide diere ondersoek, afgesien van die studies op die gewone huismossie en die Europese kuskrap (Marzal *et al.*, 2011; Torchin *et al.*, 2001).

In die aktuele studie is daar 'n geografies verteenwoordigende datastel van parasitologiese opnames van *X. laevis* wat aangewend kon word on samebindende meganismes binne hierdie gasheer-parasiet-sisteem te identifiseer. Hierdie sluit voorheen uitgevoerde opnames in Chili, Portugal en die Verenigde State in (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014), tesame met die opnames wat vir die teenswoordige projek in westelike Frankryk en suidelike Afrika voltooi is. Dit plaas die gasheer-parasiet-sisteem van *X. laevis* in 'n ongeëwenaarde posisie om 'n wêreldwye perspektief van die lot van geassosieerde parasiete gedurende die proses van indringing toe te lig. Boonop sal 'n begrip van die ruimtelike komponent van parasietdinamiek gedurende gebiedsuitbreiding ons voorsien van voorspellings oor die reaksies van gasheer-parasiet-sisteme tot aardverandering (Poulin, 2007).

In die eerste plek word die toepaslikheid van hierdie model uitgelig deur 'n toets van die ERH, die eerste wat vir 'n wêreldwye indringeramfibie met menige geografiese replikate uitgevoer word (Hoofstuk 4, hierna bekend as Schoeman *et al.*, 2019). Deur gebruik te maak van hierdie nuwe modelsisteem word daar 'n vergelyk getref tussen die inheemse en uitheemse parasietversamelings van *X. laevis* in terme van spesierykheid, infeksievlakke en gemeenskapsamestelling.

Tweedens word die dryfkragte van parasitisme in die parasietinfragemeenskappe van *X. laevis* in die natuurlike en vreemde gebiede ondersoek, in besonder die nadraai van gebiedsuitbreiding (Hoofstuk 5). Sodoende het die ondersoek gepoog om algemene response op gebiedsuitbreiding in die parasiete geassosieer met 'n wêreldwyd verspreide amfibie oop te vlek deur die faktore wat die samestelling van sy parasietversamelings in die natuurlike en vreemde gebiede te bepaal.

1.5.3 Doelstelling 3: Vergelykende biogeografie as 'n meer holistiese benadering tot die naspeuring van indringers

In gevalle waar ons parasietdatastelle in navorsing van bio-indringing inkorporeer, stel ons nie alleenlik in die rol van parasiete in die proses van indringing of in die nuut verrysende interaksies belang nie. Op 'n meer fundamentele vlak kan data vanaf parasiete 'n onafhanklike bewyslyn verskaf wat ooreen kan stem of kan uitbrei op die bewyse wat deur die gasheerdatastel daargestel word.

Dít is die grondsalg vir die idee van die "holistiese eksemplaar", waar gashere saam met hulle simbionte vir multidissiplinêre vraagstukke in biologie versamel word (Cook *et al.*, 2017). 'n Meer holistiese benadering met die oogmerk om die oorsprong en gebiedsverskuiwing van nouliks naspeurbare indringerspesies te bepaal sluit onder ander ook molekulêre data van saamingevoerde parasiete in (Clavero *et al.*, 2016). Monogeneërparasiete is voorheen voorgedoen en af en toe aangewend as merkers vir invoerings en ander vorme van gasheerbeweging (Baldwin *et al.*, 2012; Hahn *et al.*, 2015; Huyse *et al.*, 2017; Kmentová *et al.*, 2018, 2020). Deur weereens van die gasheer-parasiet-model van *X. laevis* gebruik te maak, is die werksverrigting van hierdie geïntegreerde benadering vir die waarneming van intraspesifieke kriptiese indringings in die natuurlike gebied beoordeel (Hoofstuk 6). In die besonder is die ortoloë mitochondriese merkers vir gasheer- en parasiet filogeografiese analises gebruik om te laat blyk hoe gelyke monsternemingspoging vir beide datastelle uiteenlopende insigte kan meebring.

Die keuse van merkers vir kofilogeografiese studies soos dié is uiters belangrik, omdat genoegsame resolusie voorsien moet word vir die onderskeiding tussen parasietstamlyne op die intraspesifieke vlak. Die mitochondriese merkers *COX1* en *rrnS* is die enigste twee beskikbare merkers waarvoor daar voorvoerders in die geval van die poliopistokotileër-Monogene ontwikkel is (Héritier *et al.*, 2015; Littlewood *et al.*, 1997). Nogtans het die interspesifieke vergelyking van die mitochondriese genome van diplosoïed-, girodaktilied- en daktilogiriedmonogeneërs aangedui dat ander gene heel waarskynlik meer bruikbaar vir spesie-uitkenning of selfs bevolkingstudies in hierdie families sal wees (Huyse *et al.*, 2008; Vanhove *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b). Die opgang van mitochondriese genomika het indringerbioloë van werktuie voorsien om meer gesofistikeerde molekulêre data in hulle ondersoeke in te sluit. As 'n slottoevoeging tot hierdie studie, is die mitogenoom van *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae), een van die hoogs geassosieerde parasiete van *X. laevis*, beide in die natuurlike gebied en verder, gemonteer (Hoofstuk 7). Hierdie mitogenoom dien as 'n verwysing vir toekomstige ondersoekers van die wêreldwye koïndringerparasietfamilie Polystomatidae wie dalk molekulêre merkers met hoër onderskeidingsvermoë in hulle studies in wil sluit.

1.6 Metodologiese betragtings

Hierdie projek spog met die grootste datastel van sy soort van meer as 350 paddas en 45 liggings (verwys na Bylaag A vir breedvoerige vindoorddata) – 'n statisties, geografies en taksonomies verteenwoordigende opname wat kortgekom het in vorige ondersoeke van hierdie gasheer-parasiet-sisteem.

1.6.1 Parasitologiese opnames

Met inagneming van die tekortkominge van die vorige parasitologiese opnames van *X. laevis* is hierdie studie gekonseptualiseer met bepaalde voorbehoude in gedagte. Ten eerste, slegs die parasiete van suidelike Afrikaanse *X. laevis sensu stricto*, volgens die klassifikasie van Furman *et al.* (2015), is ondersoek. Ten tweede is data vanaf vindoorde slegs gepoel indien paddas in dieselfde akwatiese sisteem versamel is. Paddas wat byvoorbeeld op dieselfde eiendom vanaf plaasdamme en verbindingsbesproeiingskanale of verbindende natuurlike riviere versamel is, is as lede van dieselfde bevolking geag. Data is so liggingspesifiek as moontlik gehou met die oogmerk om indekse van parasiet-gemeenskappe van onafhanklike bevolkings van *X. laevis* te vergelyk, in teenstelling met vorige studies waar al die versamelde gasheer as 'n eenheid beskou is (bv Cosgrove & Jared, 1974; Macnae *et al.*, 1973; Pritchard, 1964; Southwell & Kirshner, 1937; Thurston, 1970; Tinsley, 1996; Vercammen-Grandjean, 1960). Ten laaste is parasiete hoofsaaklik in molekulêre graad etanol gefikseer om latere molekulêre analises te bewerkstellig omdat betreklik min vorige studies oor die parasiete van *Xenopus* enigsins genetiese inligitng beskikbaar gestel het. Daarom is ten minste die eerste herwonne verteenwoordiger van elke parasietspesie van elke vindoord in etanol geplaas.

1.6.2 Etiese oorwegings

Dierewelsyn is veronderstel om 'n hoofsaak gedurende die beplanning en uitvoering van 'n projek in dierkunde te wees. Die nagraadse studente van die Afrika-Amfibieërbewarings-navorsingsgroep het toestemming vanaf die AnimCare-navorsingsetiekkommittee aan die Noordwes-Universiteit om die parasiete van suidelike Afrikaanse amfibieë in die algemeen te ondersoek (NWU-00006-14-A3). Die kommittee het daarby ook die uitvoering van hierdie spesifieke studie van *X. laevis* en sy parasiete goedgekeur, wat die versameling en wegmaking van tien eksemplare per vindoord in suidelike Afrika insluit (NWU-0380-16-A5-01). Permitte vir die versameling van hierdie paddas is vanaf die onderskeie provinsiale regerings bekom (0056-AAA007-00224: CapeNature; FAUNA 1343-2017: Noord-Kaap) en alle versamelaktiwiteite het met die skriftelike toestemming van die grondeienaars plaasgevind. Na versameling is die paddas in water vanaf die bron aangehou, wat op 'n

weeklikse basis met boorgatwater vervang is in lyn met die standaardwerkprosedure vir die aanhouding van paddas (AACRG-SOP-03). Die daaropvolgende verdowing met etiel-3-aminobensoaat metaansulfonaat, in die volksmond bekend as MS222 (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland), gevolg deur die knip van die rugstring en die vernietiging van die brein, is in lyn met die standaardwerkprosedure vir die eutanasie van amfibieë uitgevoer (NWU-00492-16-A5). Laastens is die karkasse van die paddas verwyder deur die Universiteit se kontrakteurs vir mediese afvalverwydering.

1.6.3 Ontwerp van monsterneming

Ten opsigte van die divergering van *X. laevis* in sy natuurlike gebied (Furman *et al.*, 2015) is daar sekergemaak dat verteenwoordigende bevolkings van al die voorheen omskryfde filogeografiese stamlyne van *X. laevis* in suidelike Afrika betrek is by die monsternemingspogings van hierdie studie.

'n Volgende oorweging gedurende die proses wat die aantal individue wat benodig is om die statisties betekenisvolle parasietgemeenskapindekse te bereken. Logistiese en etiese inperkings het die gevolg gehad dat ons die aantal individue wat per ligging versamel is tot tien beperk het. In sekere gevalle is die monstergrootte selfs laer as gevolg van lae versamelsukses.



Hoofstuk 2

Nuwe inligting oor die morfologie en molekulêre data van kamallaniednematode wat *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae) in Suid-Afrika parasiteer

2.1 Inleiding

Oor die 25 parasietgenera van sewe invertebraatgroepe is al in assosiasie met die gewone platanna *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae) in sy natuurlike suidelike Afrikaanse gebied gemeld (Tinsley, 1996). Sommige van hierdie parasiete het hulle indringergashere vanuit Afrika na Noord-Amerika, asook na Europa, gevolg (Kuperman *et al.*, 2004; Lafferty & Page, 1997). Een groep parasiete wat tot dusver nog nie van uitheemse bevolkings van *X. laevis* opgeteken is nie, is die nematode van die familie Camallanidae wat hoofsaaklik mariene en varswatervisse en minder gereeld amfibieë, skilpaaie en slange parasiteer (Stromberg & Crites, 1974).

Verteenwoordigers van kamallaniede is wydverspreid in platannas regoor die suider-Afrikaanse subkontinent – in Kenia, Nigerië, Rwanda, Uganda en Zimbabwe (Avery, 1971; Thurston, 1970; Tinsley *et al.*, 1979). In die besonder word drie spesies van kamallaniede met *X. laevis* in Suid-Afrika geassosieer: *Camallanus kaapstaadi* Southwell *et* Kirshner, 1937, *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995 en *Batrachocamallanus slomei* (Southwell *et* Kirshner, 1937).

Camallanus kaapstaadi is vanaf *X. laevis* van Kaapstad (Suid-Afrika) beskryf (Southwell & Kirshner, 1937). Daarna is dit uitgeken van ander platannas (*X. laevis* en nog *Xenopus* spp.) van Kameroen, Ghana, Kenia, Nigerië, Rwanda, noordelike en suidoostelike dele van Suid-Afrika (voorheen bekend as Transvaal en Transkei), Soedan, Tanzanië, Uganda en Zimbabwe (Avery, 1971; Jackson & Tinsley, 1995a). Daarbenewens is die junior sinoniem van *C. kaapstaadi*, *Camallanus johni* Yeh, 1960, van Tanzanië beskryf (Yeh, 1960b) en later ook van Zimbabwe, Uganda en Nigerië onder hierdie naam vermeld (Thurston, 1970). In die tussentyd het Tinsley *et al.* (1979) die bestaan van ’n spesie van *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915 in *X. wittei* Tinsley, Kobel *et* Fischberg van sentraal-Afrika vermeld, wat later as *C. kaapstaadi* uitgeken is (Jackson & Tinsley, 1995a). Daarom kan *C. kaapstaadi* as ’n wydverspreide parasiet van platannas regoor Afrika beskou word.

Die tweede kamallanied van *X. laevis*, *C. xenopodis*, is op sterkte van slegs ses vroulike eksemplare van die Kaap (Suid-Afrika) en een vroulike eksemplaar van Kenia vanuit *X. borealis* Parker (Jackson & Tinsley, 1995a) beskryf. Nie een van hierdie twee spesies is intussen weer aangeteken nie.

Die derde spesie, *B. slomei*, is ook as *Procamallanus slomei* Southwell *et* Kirshner, 1937 van *X. laevis* vanaf die Kaap (Suid-Afrika) beskryf (Southwell & Kirshner, 1937) en is amptelik vir die eerste keer sedert die oorspronklike beskrywing as *B. slomei* van platannagashere van Suid-Afrika en Zaïre aangeteken (Jackson & Tinsley, 1995b). Jackson & Tinsley (1995b) het ook *Procamallanus brevis* Kung, 1948 van *X. laevis* in Suid-Afrika (Kung, 1948) met *B. slomei* versoen en ’n *Spirocamallanus xenopodis* Southwell *et* Kirshner, 1937 in ’n platanna van Kenia (Thurston, 1970) heruitgeken as ’n lid van dieselfde spesie.

Die herbeskrywing van *B. slomei* as lid van die genus *Batrachocamallanus* Jackson *et* Tinsley, 1995 het opslae gemaak (Jackson & Tinsley, 1995b). Die genus *Batrachocamallanus* is spesiaal vir die vier spesies van *Procamallanus* Baylis, 1923 wat Afrika-amfibieë parasiteer, tot stand gebring, gebaseer op die groot aantal mukrone (meer as vyf) op die vroulike stert, betreklik kleiner liggaamsgrootte en amper identiese morfologie van die kopgedeelte, manlike koudale strukture en vroulike voortplantingsisteem wat die amfibieërparasiete van alle ander spesies van *Procamallanus* onderskei (sien Jackson & Tinsley, 1995b).

Moravec *et al.* (2006) het verskille in die aantal vroulike mukrone en assosiase met ’n amfibieërgasheer nie as genoegsame generiese eienskappe beskou nie en het aangevoer dat *Batrachocamallanus* as ’n junior sinoniem van *Procamallanus* beskou moet word. Hierdie besluit het berus op die beskrywing van *Procamallanus pacificus* Moravec, Justine, Würtz, Taraschewski *et* Sasal, 2006 van varswaterpalings (*Anguilla* sp.) (Actinopterygii: Anguillidae), met vier tot nege mukrone op die vroulike stert, en die ontdekking van *B. siluranae* Jackson *et* Tinsley, 1995, voorheen beskryf van *Xenopus tropicalis* Gray

(Anura: Pipidae), vanaf die polipteroïedvis *Erpetoichthys calabaricus* Smith (Actynopterigii: Polypteridae) (Řehulková *et al.*, 2005). Nogtans is slegs een onvolwasse vroulike eksemplaar van *B. siluranae* vanaf die polipteroïedvis herwin, wat 'n eksemplaar was wat vir die troeteldierhandel ingevoer was, wat die outeurs gelei het om die as 'n toevallige infeksie te bestempel (Řehulková *et al.*, 2005). Daarby is die klein uitsteeksels op die stert van *P. pacificus* 6 μm tot 9 μm lank terwyl die mukrone van *Batrachocamallanus* spp. wissel van 10 μm tot 15 μm (Jackson & Tinsley, 1995b; Moravec *et al.*, 2006). Derhalwe mag die mukrone van *P. pacificus* dalk nie dieselfde strukture as in *Batrachocamallanus* voorstel nie en kan waarskynlik nie vir die onderdrukking van die genus ingespan word nie. In die geheel trek hierdie faktore die geldigheid van die onderdrukking van *Batrachocamallanus* in twyfel, wat ons lei om ons eksemplare aan *B. slomei* toe te ken.

Dit is duidelik dat die inligting oor die kamallaniede van *X. laevis*, veral op die molekulêre front, verbeter moet word. Die huidige ondersoeke van drie spesies van kamallaniede wat van *X. laevis* in verskillende streke van Suid-Afrika versamel is, dra inligting oor infeksievlakke, liggings, morfologie en molekulêre data van die *28S rRNA* en *COX1*-gene by.

2.2 Metodes

In totaal is 97 *X. laevis* in tregterfuike wat met hoenderlewer geaas is vanaf agt liggings regoor die noordelike streke van Suid-Afrika gedurende November van 2016 en van Maart tot Mei van 2017 en vanaf drie liggings in die suidwestelike streke gedurende Junie en Julie van 2017 versamel (Tabel 2.1).

Die gashere is in 6% etiel-3-aminobensoaat metaansulfonaat (MS222) (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) verdoof en daarna gedood deur die rugstring te knip en die brein te verwoes, volgens internasionaal aanvaarde standaardwerkprosedures. Tydens die algehele disseksie is die spysverteringskanaal verwyder en in 0.6% ampfibieërsoutoplossing oopgemaak. Nadat hulle van die slukderm, maag en derms verwyder is, is die nematode in die soutoplossing gewas, in 70% warm etanol gefikseer en daarna in 70% etanol gestoor.

Die nematode is in laktofenol verhelder voordat hulle onder die mikroskoop ondersoek is. Die morfologie van die nematode is bestudeer en mikrofoto's is met die Nikon E800 en Nikon ECLIPSE Ni saamgestelde mikroskope geneem. Top- en dwarssnitte is met die hand voorberei. In totaal is 601 eksemplare van *B. slomei*, 39 van *C. kaapstaadi* en 53 van *C. xenopodis* bestudeer waarvan daar onderskeidelik 50 (20 mannetjies en 30 wyfies), 18 (nege mannetjies en nege wyfies) en 28 (vier mannetjies en 24 wyfies) gemeet is. Alle metings word in die teks in mikrometers gegee, behalwe as dit anders aangedui word. Dit word deur reikwydtes met gemiddelde waardes tussen hakies weergegee. Die ver-

Tabel 2.1: Geografiese oorsprong, habitat en infeksievlakke van drie nematode vanaf 97 *Xenopus laevis* (Daudin) van 11 vindoorde in Suid-Afrika. Gemiddelde infeksie-intensiteit word weergegee, tesame met mediaan intensiteit tussen blokhakies en minimum- en maksimumwaardes tussen ronde hakies. Selle met 'n.v.t.' verwys na 'n afwesigheid van nematode in die spysverteringskanaal.

Nematode	Vindoorde	Koördinate	Habitat	Aantal gashere	Intensiteit	Voorkomsyfer	Gemiddelde veelheid
Batrachocamallanus slomei Southwell *et* Kirshner, 1937	Imvubu Lodge, KwaZulu-Natal	28°47'34"S; 26°03'02"E	Begroeide dammetjie	15	1	7%	0.1
	Potchefstroom, Noordwes	26°45'20"S; 27°03'38"E	Vlak vlei	9	14 [10] (1–37)	100%	13.7
	Modimolle, Limpopo	24°26'18"S; 28°26'13"E	Sierdammetjie	6	18 [14] (2–45)	83%	15.2
	Jacana Landgoed, Witrivier, Mpumalanga	25°20'21"S; 31°01'21"E	Dam in vlei	8	9 [8] (4–16)	63%	5.6
	Tasselberry, White River, Mpumalanga	25°19'55"S; 31°02'36"E	Sierdammetjie	6	24 [26] (9–37)	100%	24.3
	Dullstroom, Mpumalanga	25°23'53"S; 30°02'17"E	Dam in bergstroom	10	13 [12] (1–30)	100%	13.0
	Letsitele, Limpopo	23°47'56"S; 30°11'42"E	Begroeide dammetjie	10	6 [5] (2–12)	100%	5.5
	Hermanus, Wes-Kaap	34°22'13"S; 19°15'25"E	Begroeide dammetjie	7	3 [2] (1–6)	57%	1.6
Camallanus kaapstaadi Southwell *et* Kirshner, 1937	Dullstroom, Mpumalanga	25°23'53"S; 30°02'17"E	Dam in bergstroom	10	4 [4] (1–8)	80%	3.4
	Ligging A, Kaapstad, Wes-Kaap	33°50'21"S; 18°36'01"E	Stedelike ontspanningsdam	5	2 [2] (1–2)	60%	1.0
Camallanus xenopodis Jackson *et* Tinsley, 1995	Dullstroom, Mpumalanga	25°23'53"S; 30°02'17"E	Dam in bergstroom	10	6 [6] (1–13)	90%	5.3
Geen kamallaniede aanwesig nie	Ligging B, Kaapstad, Wes-Kaap	33°50'08"S; 18°33'10"E	Stedelike ontspanningsdam	14	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
	Rondepan, Limpopo	23°46'10"S; 29°24'17"E	Dam in oorstroomde gras	7	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.

teenwoordigende monster (30 eksemplae) word as 'n gemiddeld met standaardafwyking uitgedruk.

Die middelfragmente van die mannetjies is gebruik vir die molekulêre studies, omdat die taksonomies belangrike voor- en agterpunte vir die morfologiese uitkenning van die spesie uitgehou is. DNA is met die KAPA Express Extraction Kit DKAPKK7103 (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) geëkstraheer. *COX1*-kopieë is met die voorvoerderpaar 'LCO1490' (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') en 'HCO2198' (5'-TAAACTTC-AGGGTGACCAAAAAATCA-3') verkry. Die termosiklusseringsprofiel was: 3 min denaturasie teen 94°C, 10 siklusse van 94°C vir 30 sek, 45°C vir 30 sek, 72°C vir 1 min en 40 siklusse van 94°C vir 30 sek, 51°C vir 1 min, 72°C vir 1 min vir amplifikasie en 72°C vir 10 min vir verlenging.

Die *28S*-kopieë is met die voorwaartse voorvoerder 'LSU5' (5'-TAGGTCGACCCGCTGAA-YTTAAGCA-3') en die truvoorvoerder 'n900r' (5'-GGTTCGATTAGTCTTTCGCC-3') geamplifiseer. Die termosiklusseringsprofiel was as volg: 5 min denaturasie teen 95°C; 40 siklusse van 30 sek teen 95°C, 30 sek teen 55°C, 2 min teen 72°C vir amplifikasie; en 'n finale 7 min verlenging teen at 72°C. Volgordes is deur BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing op 'n ABI3500XL-volgordebepaler verkry. DNA-produkte se volgordes

is in beide rigtings met die PCR se voorvoerderpare bepaal; vir die nukleêre geen is die volgende aanvullende voorvoerders gebruik: interne voorvoerders, '300F' (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') en 'ECD2' (5'-CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'). Aangrensende volgordes is gemonteer, met Geneious 9.0-sagteware (Biomatters Bpk., Auckand, Nieu-Seeland) geredigeer en op GenBank gelaai.

Vir die filogenetiese analise is Bayes-inferensie in die MrBayes-program *weergawe* 3.2.2 gebruik. Vóór die analise is die volgordes met die ClustalW-hulpmiddel in *weergawe* 7 sagteware belyn en tot op die lengte van die kortste volgorde besnoei (497 nukleotiede van *28S* en 312 nukleotiede van *COX1*). Die Bayes-analise is met die volgende nukleotiedvervangingsmodelinstellings uitgevoer: `nst = 6`, `rates = invgamma`, `ncat = 4`, `shape = estimate`, `inferrates = yes` en `basefreq = empirical`, wat met die algemene tydsomkeerbare model GTR+G+I ooreenstem (Gu *et al.*, 1995; Tavaré, 1986; Yang, 1994). Die nukleotiedvervangingsmodel is met JModelTest *weergawe* 2.1.7 sagteware bepaal. Verdere analise is met die volgende parameters voltrek: `mcmc ngen = 200000` vir die *28S*-belynings en `ngen = 100000` vir die *COX1*-belynings, `samplefreq = 100`, `printfreq = 100` en `diagnfreq = 1000`. Bome is deur die FigTree *weergawe* 1.4.3-sagteware uitgebeeld (Rambaut, 2018).

2.3 Resultate

2.3.1 Morfologiese beskrywings

***Batrachocamallanus slomei* (Southwell *et* Kirshner, 1937)**

Gasheer: *Xenopus laevis* (Daudin) (Amphibia: Anura: Pipidae).

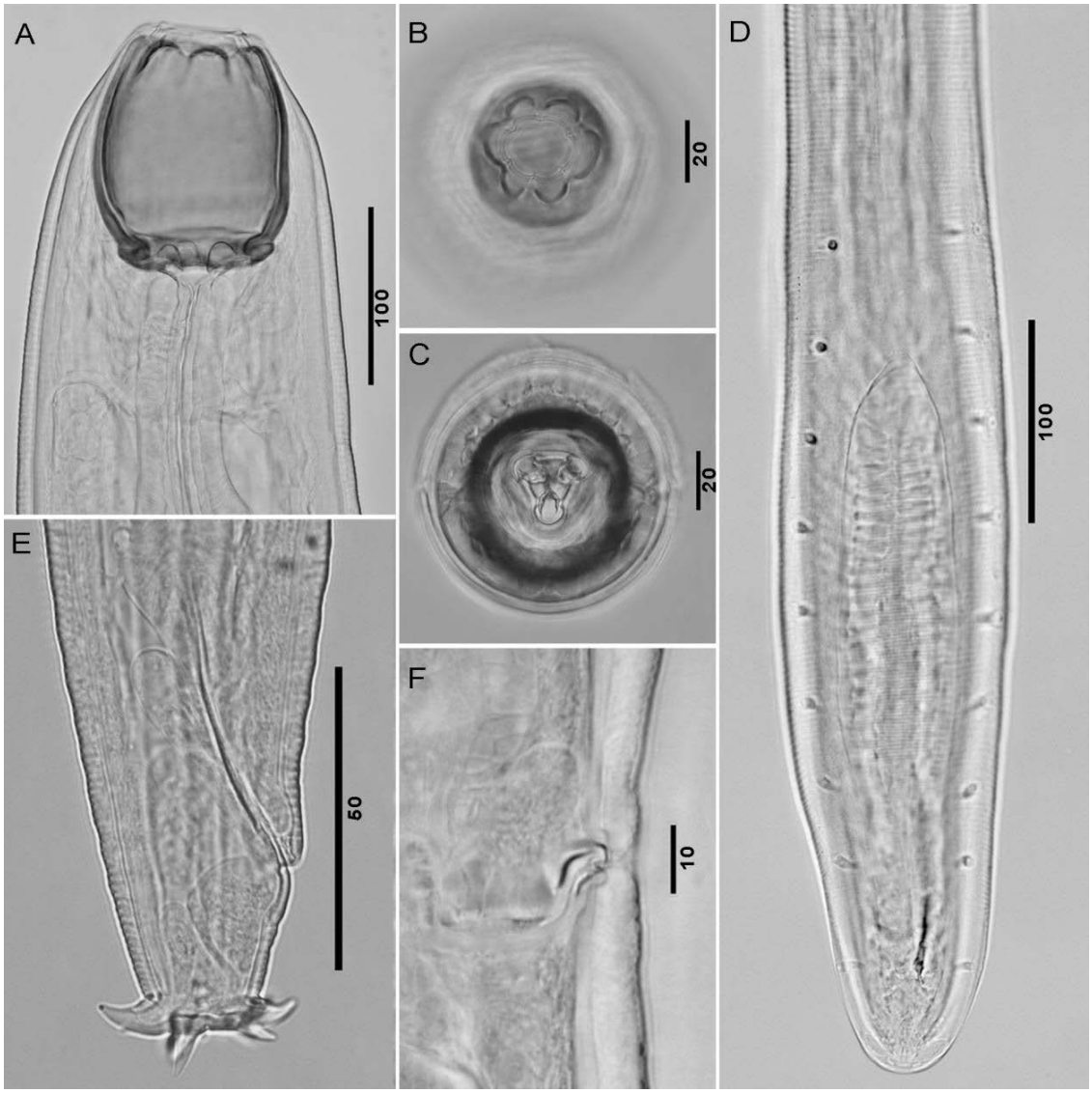
Liggings: KwaZulu-Natal, Mpumalanga, Limpopo, Noordwes, Wes-Kaap (sien Tabel 2.1).

Infeksieplek: Maag, slukderm.

Verteenwoordigende DNA-volgordes: MG948463 (*COX1*), MG947390 (*28S*).

Figuur 2.1

Algemene beskrywing. Liggaam klein, gewoonlik na onder gekrul, betreklik dik, met maksimumbreedte by voorste derde se vlak. Kutikula met prominente dwarsgroewe. Toppunt (Figuur 2.1b): mondopening gerond, omring deur ses plat opheffings (twee groteres lateraal en vier submediaal); ses labiale papille, vier sefaliese papille; twee amfiede. Bukkaalkapsule met welgesklerotiseerde wande, effens langer as breed met opvallende basaalring en sonder interne riwwe (Figure 2.1a,c). Spierslukderm omring met



Figuur 2.1: *Batrachocamallanus slomei* Southwell *et* Kirshner, 1937 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mikrofoto's. **a** – voorpunt, wyfie, syaansig; **b** – voorpunt, mannetjie, vooraansig; **c** – voorpunt, mannetjie, optiese snit by die basis van die bukkaalkapsule se vlak; **d** – stertpunt, mannetjie, onderaansig; **e** – agterpunt, wyfie, syaansig; **f** – gedeelte van vroulike geslagsisteem by die vulva se vlak, syaansig.

drie tand-agtige uitsteeksels van basaalring (Figuur 2.1c). Spierslukderm knuppelvormig met verlengte agterbol. Klierslukderm effens langer as spierslukderm, amper silindries maar effens breër aan agterpunt. Senuweering omsingel sperslukderm by naaste derde se vlak. Uitskeidingsporie by die spierslukderm se midlengte se vlak. Piepklein papilvormige deïried by uitskeidingsporie se vlak geleë. Intestinum reguit, smal. Rektum reguit, met dun wande (Figuur 2.1e). Stert dun af met etlike mukrone in wyfies (Figuur 2.1e) en ronde punt in mannetjies (Figuur 2.1d).

Mannetjie (morfometrie gebaseer op 20 eksemplare). Liggaam 1.94–2.80 mm (2.32 mm) lank, 96–157 (120) maksimumbreedte. Bukkaalkapsule 93–112 (102) lank, insluitend basaalring 7–14 (11) lank, 53–75 (61) breed met maksimumbreedte 67–94 (76) teen

midlengte en minimumbreedte 26–53 (35) by die voorpunt. Minimum- en maksimumdikte van bukkaalkapsuulwande naby aan mondopening 2–4 (2.5) en aan basaalring 4–10 (6). Spierslukderm 188–282 (235) lank, 9–12% (10%) van liggaamslengte; 33–56 (43), 33–43 (38) en 60–97 (75) breed by onderskeidelik voorpunt, midlengte en bol se vlak. Kliersluk derm 208–366 (301) lank, 10–15% (13%) van liggaamslengte; onderskeidelik 46–81 (58), 32–68 (52) en 32–88 (65) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering teen 153–200 (177) vanaf voorpunt. Uitskeidingsporie en deïriede onderskeidelik by 127–280 (217), 6–11% (9%) van liggaamslengte en 213–260 (238), 9–12% (10%) van liggaamslengte vanaf voorpunt geleë. Agterste gedeelte na onder gekrul, voorsien van goedontwikkelde vesikulêre stertvleuels deur gesteelde papille naby midlengte ondersteun. Agterpunt van vleuels effens opgehef en op onderste oppervlak gelas om skynsuier te vorm. Stert keëlvormig met geronde punt, 37–50 (42) lank. Stertstreek met gesteelde papille (Figuur 2.1d): agt pare voor kloaak; een paar teen kloaak en drie pare na kloaak. Drie pare van steellose papille omring kloaak (een effens na voorpunt en twee effens na agter). Spikule onewe, eenvoudig met skerppuntige distale punte. Regterspikuul duidelik sigbaar, 90–115 (101) lank; linker ene minder gesklerotiseerd, 15–37 (25) lank. Gubernakel afwesig.

Wyfie (morfometrie gebaseer op 30 eksemplare). Liggaam 1.67–3.51 mm (2.87 mm $\pm$ 0.54) lank, 163–284 (225 $\pm$ 39) maksimumbreedte. Bukkaalkapsule 105–138 (122 $\pm$ 9) lank, insluitend basaalring 10–17 (14 $\pm$ 2) lank, 63–90 (76 $\pm$ 7) breed; maksimumbreedte 86–113 (103 $\pm$ 6) by midlengte en minimumbreedte 34–71 (48 $\pm$ 9) by voorpunt. Minimum- en maksimumdikte van bukkaalkapsuulwande naby aan mondopening 2–6 (3 $\pm$ 1) en aan basaalring 4–11 (8 $\pm$ 2). Spierslukderm 242–337 (288 $\pm$ 22) lank, 8–17% (10% $\pm$ 2) van liggaamslengte; onderskeidelik 38–72 (51 $\pm$ 8), 40–60 (49 $\pm$ 5) en 68–116 (95 $\pm$ 12) breed by voorpunt, midlengte en bol se vlak. Kliersluk derm 248–526 (369 $\pm$ 62) lank, 9–18% (13% $\pm$ 2) van liggaamslengte; onderskeidelik 48–78 (65 $\pm$ 8), 38–76 (60 $\pm$ 9) en 57–108 (78 $\pm$ 15) breed by die voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering teen 161–221 (206 $\pm$ 14) vanaf voorpunt. Uitskeidingsporie en deïriede onderskeidelik by 184–326 (246 $\pm$ 27), 7–13%, (9% $\pm$ 2) van liggaamslengte, en 196–298 (242 $\pm$ 27), 6–11% (9% $\pm$ 1) van liggaamslengte vanaf voorpunt geleë. Vulva (Figuur 2.1f) naby liggaam se midlengte by 1.13–1.94 mm (1.61 mm $\pm$ 0.27) vanaf voorpunt geleë; 42–60% (54% $\pm$ 3) van liggaamslengte. Stert 34–59 (48 $\pm$ 6) lank met vyf tot sewe mukrone op punt (Figuur 2.1e).

***Camallanus kaapstaadi* Southwell *et* Kirshner, 1937**

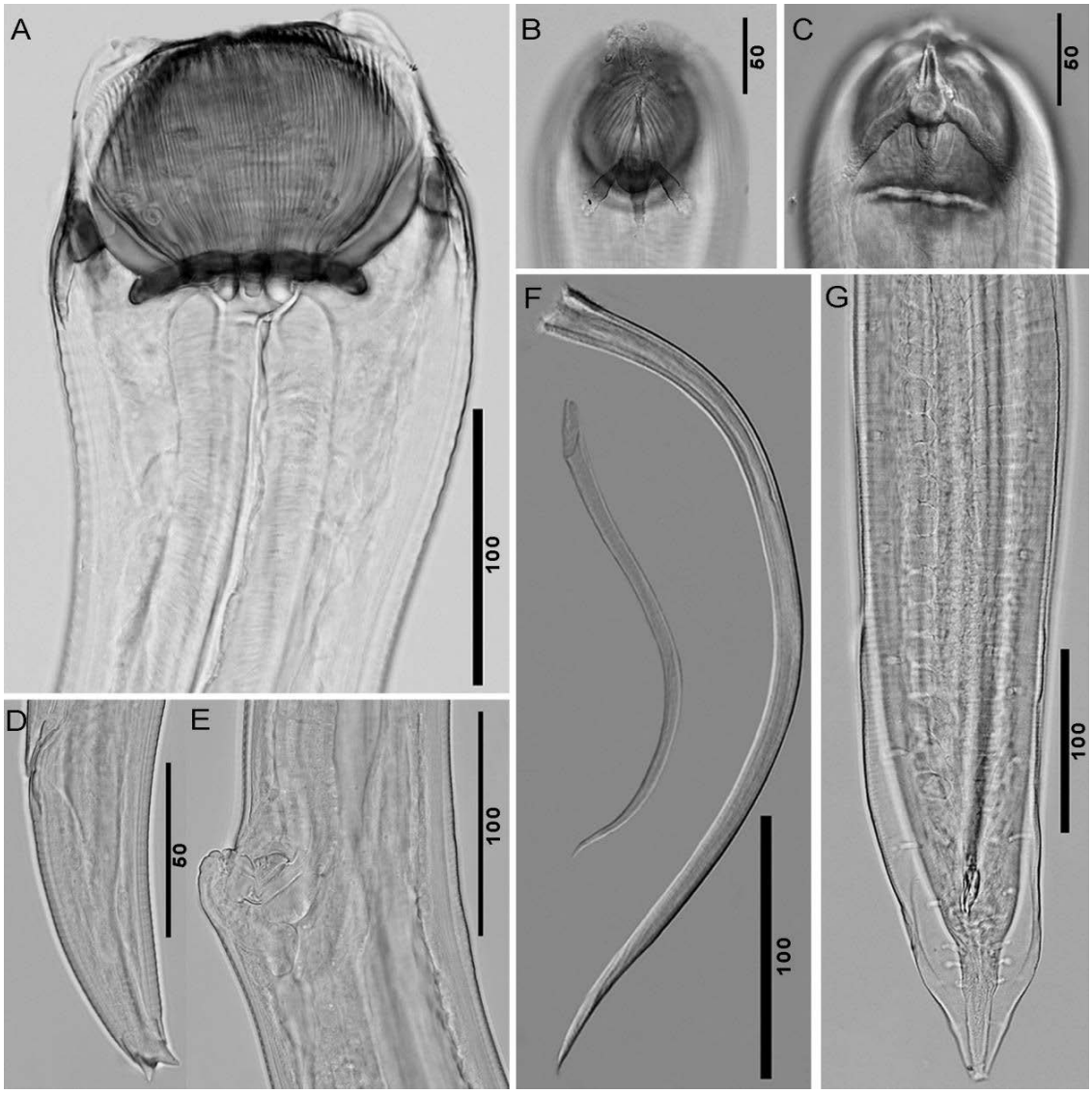
Gasheer: *Xenopus laevis* (Daudin) (Amphibia: Anura: Pipidae).

Liggings: Mpumalanga, Wes-Kaap (sien Tabel 2.1).

Infeksieplek: Slukderm, maag.

Verteenwoordigende DNA-volgordes: MG948461 (*COX1*), MG947391 (*28S*).

Figuur 2.2



Figuur 2.2: *Camallanus kaapstaadi* Southwell *et* Kirshner, 1937 vanaf *Xenopus laevis* Daudin, mikrofoto's. **a** – voorpunt, mannetjie, syaansig; **b** – dorsaaldrietand, mannetjie, syaansig; **c** – ventraaldrietand, mannetjie, syaansig; **d** – agterpunt, wyfie, syaansig; **e** – gedeelte van vroulike geslagsisteem by die vulva se vlak, syaansig; **f** – linker- en regterspikule, syaansig; **g** – stertpunt, onderaansig.

Algemene beskrywing. Mediumgrootte wurms, na bo gekrul, liggaam betreklik dik met maksimumbreedte by voorste derde se vlak. Kutikula met prominente dwarsgroewe oor hele liggaam behalwe by bukkaalkapsule. Toppunt: mondopening dwars gekloof; vier opvallende submediale sefaliese papille. Bukkaalkapsule bestaan uit vier kleppe elk deur etlike primêre volledige riwwe ondersteun (Figure 2.2a,b). Vier gesklerotiseerde plate op uitwendige oppervlak van kleppe naby hulle voorste rand geleë. Dik gesklerotiseerde basaalring by basis van bukkaalkapsule teenwoordig. Kleppe van bukkaalkapsule deur

twee prominente drietande op die onder- en bokante ondersteun (Figure 2.2b,c). Elke drietand bestaan uit drie tande wat na agter wys. Middelste tande effens langer as sublaterale tande. Drietande gewoonlik onewe, begin by midlengte van bukkaalkapsule se vlak en eindig effens agter die basaalring se vlak. Spierslukderm knuppelvormig met verlengde agterbol. Klierslukderm byna selfde lengte as spierslukderm, silindries tot by $^{3}/_{4}$-lengte met effense breër agterste kwart. Senuweering omsingel spierslukderm by agterste kwart se vlak. Uitskeidingsporie se opening op onderste sy effens agter die senuweering se vlak. Deïriede piepklein, papilvormig, by agterste derde van spierslukderm se vlak geleë. Intestinum en rektum reguit, smal. Stert dun af.

Mannetjie (morfometrie gebaseer op nege eksemplare). Liggaam 2.66–3.28 mm (3.04 mm) lank, 102–171 (149) breed. Kleppe van bukkaalkapsule 62–100 (83) lank, 65–118 (106) breed, deur 16–31 (26) riwwe gesteun, waarvan 7–10 (8) onvolledig. Basaalring 7–14 (10) lank, 52–89 (77) breed. Boonste drietand 51–72 (66) lank en 15–23 (19) breed in syaansig, onderste ene 48–67 (58) lank en 17–23 (20) breed. Spierslukderm 261–381 (338.4) lank, 9.8–12.3% (11.1%) van liggaamslengte; onderskeidelik 53–63 (58.8), 46–61 (53.9) en 58–95 (86.1) breed by voorpunt, midlengte en bol se vlak. Klierslukderm 275–461 (368.5) lank, 9.1–14.9% (12.1%) van liggaamslengte; onderskeidelik 35–96 (61.5), 44–82 (59.5) en 42–76 (59.9) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering, uitskeidingsporie en deïriede (afstand na deïriede in drie eksemplare gemeet) onderskeidelik 150–246 (182.9), 191–277 (216.1) en 226–257 (241.7) vanaf voorpunt. Stervleuels dun, ventrolateraal, gesteun deur papille: ses pare gesteelde papille voor kloaak (Figuur 2.2g); een paar gesteelde papille by kloaak; vyf pare gesteelde papille na kloaak (drie prominente pare effens agter kloaak en twee klein pare naby stert se punt). Daarby, twee pare steellose papille teen kloaak effens voor en agter kloaak geleë. Spikule onewe, eenvoudig met skerp punte (Figuur 2.2f). Regterspikuul prominent, 287–468 (422.5) lank; linker ene minder gesklerotiseerd (gemeet in drie eksemplare), 198–220 (211.7) lank. Stert keëlvormig met twee piepklein stekels op punt (Figuur 2.2g), 74–104 (91.5) lank, 2.5–3.2% (3.0%) van liggaamslengte.

Wyfie (morfometrie gebaseer op nege eksemplare). Gewoonlik groter as mannetjies. Liggaam 2.80–5.13 mm (3.62 mm) lank, 201–293 (242) breed. Kleppe van bukkaalkapsule 95–149 (116) lank, 81–174 (147) breed, deur 31–38 (34) riwwe gesteun, waarvan 7–10 (9) onvolledig. Basaalring 9–20 (13) lank, 71–125 (106) breed. Boonste drietand 72–102 (86) lank en 21–29 (25) breed in syaansig, onderste ene 63–88 (76) lank en 14–35 (24) breed. Spierslukderm 373–451 (414) lank, 7–14% (12%) van liggaamslengte; onderskeidelik 58–87 (76), 46–79 (69) en 97–140 (123) breed by voorpunt, midlengte en bol se vlak. Klierslukderm 313–531 (390) lank, 6–15% (11%) van liggaamslengte; onderskeidelik 50–91 (72), 49–91 (66) en 52–105 (79) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering, uitskeidingsporie en deïriede (afstand na deïriede in vyf eksemplare gemeet) onderskeidelik by 183–242 (220), 229–307 (266) en 261–375 (306) vanaf voorpunt. Vulva na die ewenaar, opening agter opvallende uitsteeksel van

liggaamswand by 1.67–2.64 mm (2.16 mm) vanaf agterpunt (Figuur 2.2e), 51–63% (60%) van liggaamslengte. Stert dun af, 124–179 (143) lank, 3–5% (4%) van liggaamslengte, met drie mukrone, 5–11 (8) lank, op sy punt (Figuur 2.2d).

***Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995**

Gasheer: *Xenopus laevis* (Daudin) (Amphibia: Anura: Pipidae).

Ligging: Wes-Kaap (sien Tabel 2.1).

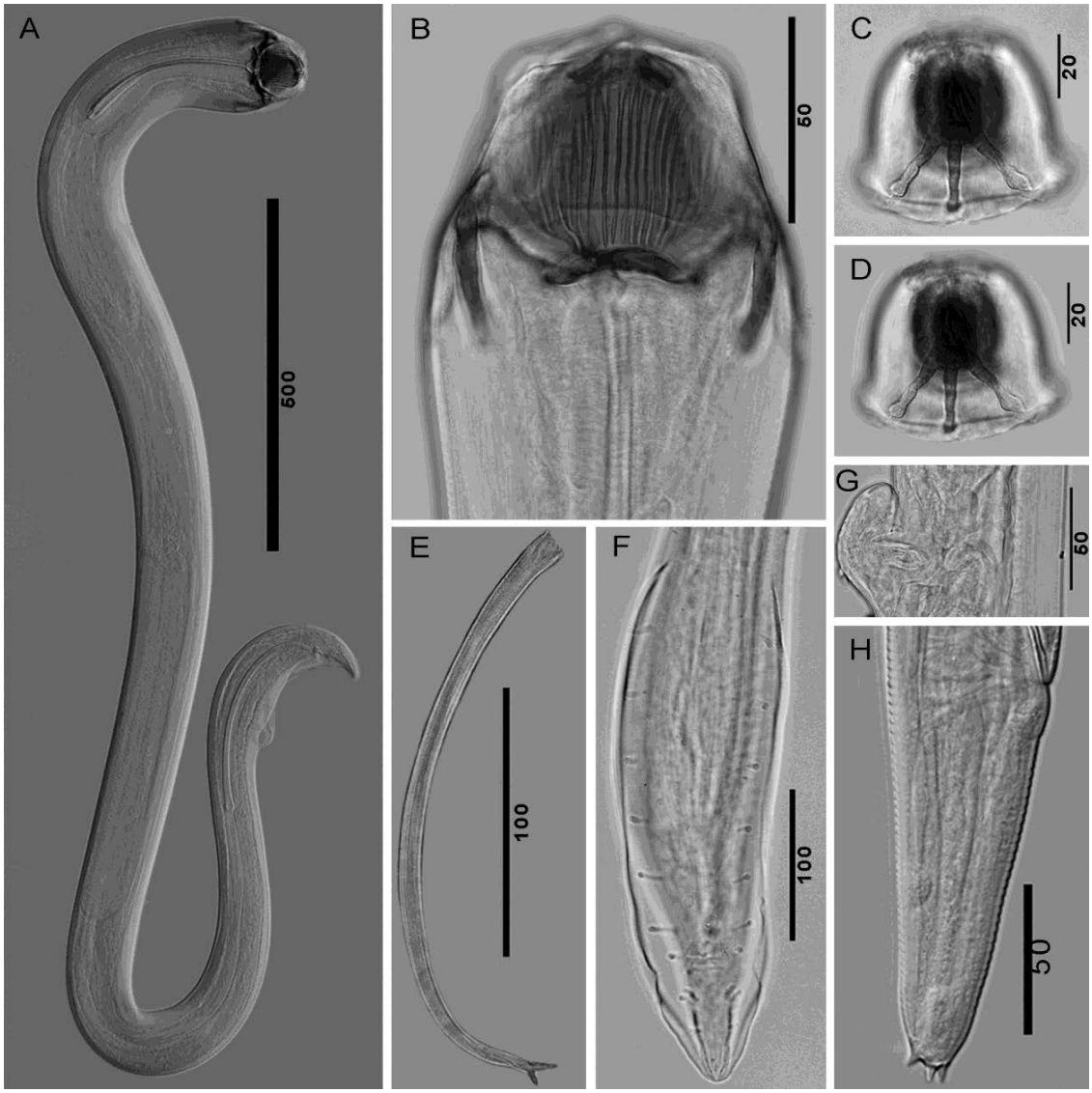
Infeksieplek: Intestinum.

Verteenwoordigende DNA-volgordes: MG948462 (*COX1*), MG947389 (*28S*).

Figure 2.3 & 2.4

Algemene beskrywing. Mediumgrootte wurms, na bo gekrul, liggaam betreklik dik met maksimumbreedte by voorste derde se vlak. Kutikula met prominente dwarsgroewe duidelik sigbaar vanaf basaalring se vlak tot agterpunt. Toppunt: mondopening dwars gekloof, vier opvallende submediale sefaliese papille. Bukkaalkapsule betreklik klein, bestaan uit twee kleppe, gesteun deur riwwe in die lengte af, met vier dun plate op die voorste rand, gesklerotiseerde basaalring by basis en twee drietande (Figure 2.3b–d, 2.4a–c). Drietande prominent, dieselfde vorm, byna ewe groot, met middelste tande effens langer as die sublaterale tande (Figure 2.3c,d, 2.4b,c). Drietande begin by midlengte van bukkaalkapsule se vlak en eindig effens agter die basaalring. Spierslukderm knuppelvormig met verlengde agterste bol. Klierslukderm byna selfde lengte as spierslukderm, silindries behalwe vir effense breër of smaller agterste kwart. Plasing van senuweering wissel binne die spierslukderm se voorste derde. Uitskeidingsporie se opening op onderste sy effens agter die senuweering se vlak. Deïriede piepklein, papilvormig, by midlengte van spierslukderm se vlak geleë. Intestinum en rektum reguit, smal. Stert dun af.

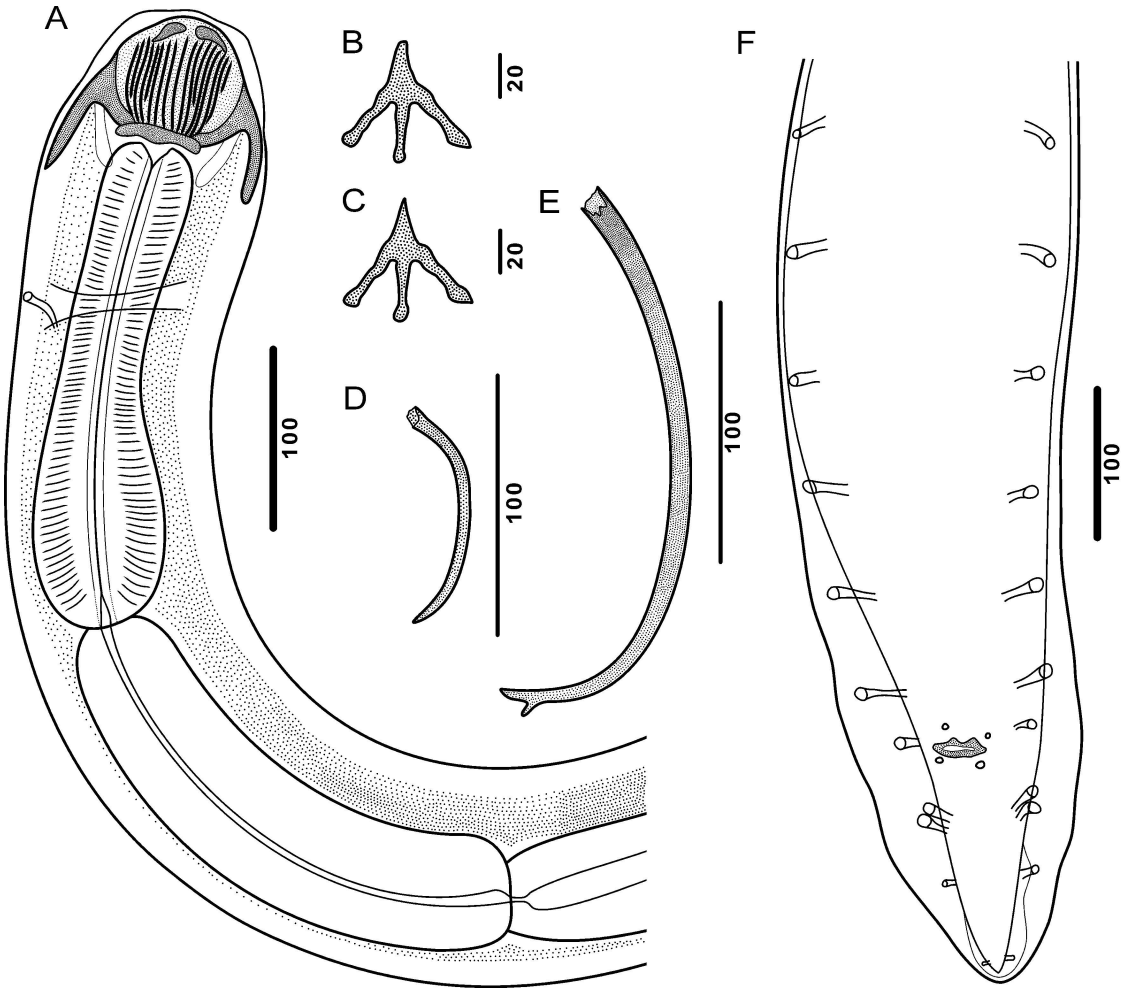
Mannetjie (morfometrie gebaseer op vier eksemplare). Liggaam 2.88–3.30 mm (3.04 mm) lank, 113–127 (118) breed (Figuur 2.3a). Kleppe van bukkaalkapsule 62–70 (66) lank, 72–82 (77) breed, deur 18–22 (20) riwwe gesteun, waarvan 4–6 (5) onvolledig. Basaalring 5–11 (9) lank, 50–55 (53) breed. Boonste drietand (Figure 2.3c, 2.4b) 57–69 (62) lank en 10–18 (15) breed in syaansig, onderste ene (Figure 2.3d, 2.4c) 51–63 (59) lank en 9–16 (13) breed. Spierslukderm 257–305 (284) lank, 9–11% (9%) van liggaamslengte; onderskeidelik 43–51 (45.5), 38–45 (41) en 59–74 (65) breed by voorpunt, midlengte en bol se vlak. Klierslukderm 209–313 (271) lank, 7–11% (9%) van liggaamslengte; onderskeidelik 39–61 (47), 38–58 (49) en 34–73 (53) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering, uitskeidingsporie en deïriede (afstand na deïriede in een eksemplaar gemeet) onderskeidelik by 140–159 (149), 184–211 (198) en 213 vanaf voorpunt. Stertvleuels betreklik smal, ventrolateraal, deur papille gesteun (Figuur 2.3f,



Figuur 2.3: *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mikrofoto's. **a** – mannetjie, algemene aansig; **b** – voorpunt, wyfie, syaansig; **c** – dorsaaldrietand, mannetjie, syaansig; **d** – ventraaldrietand, mannetjie, syaansig; **e** – regterspikuul, syaansig; **f** – stertpunt, mannetjie, onderaansig; **g** – gedeelte van vroulike geslagsisteem by die vulva se vlak, syaansig; **h** – agterpunt, wyfie, syaansig.

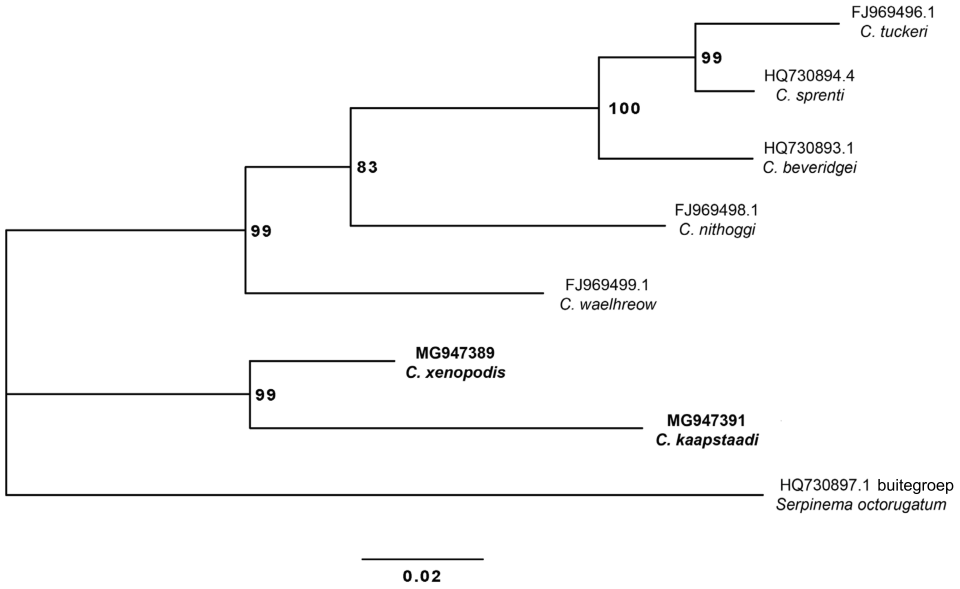
2.4f): ses pare gesteelde papille voor kloaak; een paar gesteelde papille teen kloaak; vier pare gesteelde papille agter kloaak (twee prominente pare effens agter kloaak een paar by midlengte van stert en een paar klein papille naby stert se punt). Twee pare steellose papille teen kloaak effens voor an agter kloaak geleë. Spikule onewe. Regterspikuul (Figure 2.3e, 2.4e) 323–356 (335) lank met kort keëlvormige uitsteeksel wat na bo wys by punt. Linkerspikuul korter, 96–98 lank (in twee eksemplare gemeet), swak gesklerotiseerd, met eenvoudige skerp punt (Figuur 2.4d). Stert dun af met gladgeronde punt (Figure 2.3f, 2.4f).

Wyfie (morfometrie gebaseer op 24 eksemplare). Gewoonlik groter as mannetjies. Liggaam 3.33–5.13 mm (4.20 mm) lank, 136–241 (177) breed. Kleppe van bukkaalkapsule



Figuur 2.4: *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995 vanaf *Xenopus laevis* (Daudin), mannetjie, lynsketse. **a** – voorpunt, syaansig; **b** – dorsaaldrietand, syaansig; **c** – ventraaldrietand, syaansig; **d** – linkerspikuul, syaansig; **e** – regterspikuul, syaansig; **f** – stertpunt, onderaansig.

73–85 (81) lank, 73–104 (93) breed, deur 14–22 (18) riwwe gesteun, waarvan 3–7 (5) onvolledig. Basaalring 8–14 (11) lank, 62–74 (67) breed. Boonste drietand 53–93 (76) lank en 11–25 (16) breed in syaansig, onderste ene 61–85 (75) lank en 12–20 (16) breed. Spierslukderm 326–433 (353) lank, 7–12% (9%) van liggaamslengte; onderskeidelik 48–68 (58), 39–59 (51) en 76–104 (89) breed by voorpunt, midlengte en bol se vlak. Klierslukderm 310–455 (374) lank, 7–11% (9%) van liggaamslengte; onderskeidelik 42–84 (61), 51–111 (71) en 48–85 (66) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering, uitskeidingsporie en deïriede (afstand tot deïriede in agt eksemplare gemeet) onderskeidelik by 171–212 (186), 210–256 (228) and 180–291 (247) vanaf voorpunt. Vulva opening agter opvallende uitsteeksel van liggaamswand by 1.72–2.59 mm (2.14 mm) vanaf voorpunt (Figuur 2.3g), 47–54% (51%) van liggaamslengte. Stert dun af, 94–165 (129) lank, 3–4% (3%) van liggaamslengte, met drie mukrone, 5–7 lank, op sy punt (Figuur 2.3h).



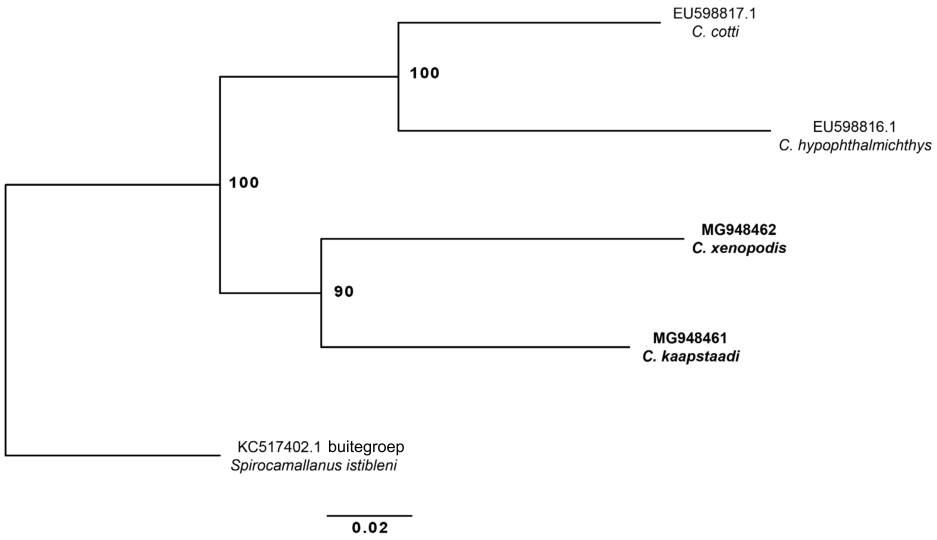
Figuur 2.5: Filogenetiese boom van sewe spesies van *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915, gebaseer op gedeeltelike *28S*-volgordes.

2.3.2 Molekulêre analise

Vir al drie spesies is die gedeeltelike *28S*-geen en *COX1*-fragment se volgordes bepaal. Gedeeltelike volgordes van die *28S*-subeenheid van *Camallanus* vanuit Australiese varswaterskilpaaie was slegs vir vyf spesies beskikbaar. Hierdie spesies is vir die filogenetiese analise gebruik en *Serpinema octorugatum* (Baylis, 1933) is as buitegroep aangewend aangesien dit die meer naverwante genus aan *Camallanus* is (see Kuzmin *et al.*, 2011). Die resulterende boom (Figuur 2.5) het die onderlinge verwantskappe tussen *C. tuckeri* Kuzmin, Tkach, Snyder *et* Maier, 2009, *C. sprent*i Kuzmin, Tkach, Snyder *et* Bell, 2011, *C. waelhreow* Rigby, Sharma, Hechinger, Platt *et* Weaver, 2008, *C. nithoggi* Rigby, Sharma, Hechinger, Platt *et* Weaver 2008 en *C. beveridgei* Kuzmin, Tkach, Snyder *et* Bell, 2011 wt deur Kuzmin *et al.* (2011) aangedui is, bevestig en het hulle verlangse verhouding met *C. kaapstaadi* en *C. xenopodis* aangetoon.

Die *COX1*-volgordes was slegs vir twee spesies van *Camallanus* beskikbaar, naamlik *C. cotti* Fujita, 1927 en *C. hypophthalmichthys* Dogel *et* Akhmerov, 1959, oorspronklik vanuit visse in die Oostelike Paleoarktiese gebied beskryf (Moravec & Justine, 2006; Moravec *et al.*, 2004). Vir hierdie analises is *Spirocamallanus istiblenni* Noble, 1966 as buitegroep gebruik. Die topologie van die filogenetiese boom het verlangse verwantskappe tussen *Camallanus* van Afrika-paddas en van Asiatiese visse aangedui wat in twee sterk gesteunde klades gegroepeer het.

Aangesien nóg *28S* nóg *COX1*-volgordes van *Batrachocamallanus* en *Procamallanus* op GenBank beskikbaar was, kon ons nie ’n filogenetiese analises met *B. slomei* uitvoer nie. Dus is die verteenwoordigende volgordes van daardie spesie bloot aan GenBank



Figuur 2.6: Filogenetiese boom van vier spesies van *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915, gebaseer op gedeeltelike *COX1*-volgordes.

voorgelê.

2.4 Bespreking

Deur die loop van die huidige studie is al drie spesies van kamallaniednematode wat voorheen opgeteken is, vanuit *X. laevis* herwin. Die mees algemene nematode wat in die huidige studie teëgekom is, was *B. slomei*, oral aangeteken behalwe by drie liggings met voorkomssyfers wat tussen 7% en 100% gelê het (Tabel 2.1). Daarteenoor is die ander twee spesies slegs by twee liggings gevind. Beide *C. kaapstaadi* en *C. xenopodis* is slegs by een ligging gevind, naamlik ’n reeks damme in ’n bergstroom naby Dullstroom (Mpumalanga-provinsie, noordelike dele van Suid-Afrika) en *C. kaapstaadi* op sy eie is by een ligging in Kaapstad gevind (Wes-Kaap). Die hoër vlak van nematoodverskeidenheid by die spesifieke ligging waar beide *Camallanus*-spesies voorkom, stem ooreen met hoër getalle van ander parasiete (lintwurms, monogeneërs, digeneërs en parasitiese geleedpotiges) wat ook hier gevind is, teenoor ander liggings (ongepubliseerde data). Ons is van mening dat die verskynsel deur die ongerepte toestand van die habitat en die afwesigheid van menslike versteuring verklaar kan word, wat ’n beter omgewing vir parasietsiklussering toelaat.

Ons resultate bevestig die teenwoordigheid van *C. kaapstaadi* in Suid-Afrika, gegewe die feit dat etlike van die vorige meldings vanaf die meer noordelike dele van Afrika, soos Kameroen, Ghana, Kenia, Nigerië, Rwanda, Soedan, Tanzanië, Togo, Uganda en Zimbabwe, kom (Avery, 1971; Jackson & Tinsley, 1995a; Thurston, 1970; Tinsley *et al.*, 1979; Yeh, 1960b). Ons het *C. xenopodis* in die noorde van Suid-Afrika gevind, wat ’n

minder onderbroke verspreiding as die twee vorige meldings vanaf die Kaap en Kenia suggereer (Jackson & Tinsley, 1995a). Ons stel voor dat die spesies van *Camallanus* in platannas meer wydverspreid is as die indruk wat vorige studies gelaat het en wat in verdere studies uitgebou sal word.

Batrachocamallanus slomei is hoofsaaklik in die maag gevind, maar in sekere gevalle ook in die slukderm. Ons bevindinge het geen korrelasie tussen die aantal nematode in die maag en hulle teenwoordigheid in die slukderm van dieselfde padda uitgewys nie. Die padda met die hoogste infeksie van *B. slomei* het, byvoorbeeld, 36 nematode in die maag en een nematode in die slukderm gehuisves, terwyl 'n ander padda 15 in die maag en 17 in die slukderm gehad het. Slegs een eksemplaar van *C. kaapstaadi* is in die maag gevind terwyl alle ander eksemplare die slukderm van vier paddas met *B. slomei* gedeel het. *Camallanus xenopodis* is slegs in die intestinum van *X. laevis* gevind en geen ander nematoodspesies is vanaf hierdie deel van die spysverteringskanaal bekend nie.

Die gemelde morfometriese eienskappe van *B. slomei* wissel merkbaar en stem met die voorheen beskikbare data ooreen (Jackson & Tinsley, 1995b; Southwell & Kirshner, 1937). Ons data brei die bestaande reikwydtes van liggaamslengte en -breedte, lengte van die manlike spikule en die afstand tussen voorpunt en vulva in wyfies uit. In die algemeen is daar geen verskille in morfometriese eienskappe van *B. slomei* tussen die liggings gevind nie.

Die waargenome eienskappe van *C. kaapstaadi* en *C. xenopodis* het ook in 'n hoë mate in die bestudeerde monster gewissel, hoewel meeste hiervan binne die reikwydtes van die voorheen bekende data gelê het (Jackson & Tinsley, 1995a; Southwell & Kirshner, 1937; Thurston, 1970). In die eerste beskrywing van *C. kaapstaadi* het die skrywers genoem dat die manlike linkerspikuul omtrent 200 μm lank was en ook minder gesklerotiseerd as die regter een was (Southwell & Kirshner, 1937). In die latere herbeskrywing was die skrywers dit eens dat die linkerspikuul moeilik sigbaar is, maar hulle het 'n gemiddelde afmeting van 155 μm gegee (Jackson & Tinsley, 1995a). In ons eksemplare het alle mannetjies van *C. kaapstaadi* 'n opvallende linkerspikuul met 'n gemiddelde lengte van omtrent 212 μm besit. Hierdie afmeting is langer as die een wat vir *C. kaapstaadi* vanuit *X. laevis* deur Jackson & Tinsley (1995a) gemeld is, waarskynlik omdat die eksemplare in ons studie oor die algemeen groter is (2.25 mm in Jackson & Tinsley (1995a) teenoor 3.04 mm in die huidige studie). Hierdie onderskeid is ook in die gemiddelde afmeting van die regterspikuul gevind (273 μm teenoor 423 μm). Terselfdertyd is die linkerspikuul van *C. xenopodis* waarlik onopsigtelik onder ligmikroskopie, selfs toe dit onder hoë vergroting met differensiële interferensiekontras bekyk is. Nietemin is die bestaan van die linkerspikuul op grond van die disseksie van die mannetjie se stertgedeelte bevestig.

Onder ons eksemplare is daar meer wyfies as mannetjies van al die spesies gevind, alhoewel daar slegs by *C. xenopodis* vier maal meer wyfies as mannetjies was. Daarom

is dit duidelik hoekom die spesie voorheen slegs op die basis van wyfies beskryf is (Jackson & Tinsley, 1995a). Mannetjies in ons monster van *C. xenopodis* het oor verskeie eienskappe, soos die struktuur van die bukkaalkapsule, die aantal riwwe op sy kleppe en grootte en vorm van die drietande en die manlike regterspikuul, beskik, wat soortgelyk is aan *C. mazabukae* Kung, 1948. Ten spyte hiervan is daar twee eienskappe, naamlik aantal mukrone (vyf of ten minste vier in *C. mazabukae* teenoor slegs drie in *C. xenopodis*) en die liggaamsvorm (*C. mazabukae* wat na onder krul terwyl alle herwonne eksemplare van *C. xenopodis* na bo krul), wat ons genoop het om die versamelde eksemplare aan *C. xenopodis* toe te ken.

Nietemin wys die prentjie van die vroulike stert van *C. mazabukae* in die oorspronklike beskrywing (Kung, 1948) dat die eksemplaar eintlik dalk na bo krul. Boonop is die spesie slegs op grond van twee eksemplare vanaf die swak uitgekende gasheer, gemerk as ”brulpadda”, beskryf. Aangesien geen *Camallanus* al vanuit die grootbrulpadda (*Pyxicephalus adsperus* Tschudi) of die kleinbrulpadda (*Pyxicephalus edulis* Peters) (Halajian *et al.*, 2013, ongepubliseerde data) voor hierdie aantekening of enigsins daarna gemeld is nie, veronderstel ons dat dit ’n opportunistiese infeksie of ’n verkeerde gasheeruitkenning is. Na aanleiding hiervan verkies ons om ons eksemplare as *C. xenopodis* uit te ken terwyl die taksonomiese status van *C. mazabukae* in verdere studies van *Camallanus* vanuit verskillende amfibieë in Afrika toegelig moet word.

Die gebrek aan beskikbare DNA-belynings in GenBank het ons nie toegelaat om robuuste filogenetiese analises van die herwonne spesies uit te voer nie. Beide die filogenetiese bome (gebaseer op gedeeltelike *28S* en *COX1*-belynings) wys dat spesies van *Camallanus* van Suid-Afrikaanse amfibieë ’n goed ondersteunde klade, afgesonder van die klades van spesies van Asiatiese visse of Australiese varswaterskilpaaie vorm. Ongelukkig kan ons nie hierdie groep as monofiletiese beskou nie, aangesien geen data van *Camallanus* van visse (*C. polypteri* Kabre *et* Petter, 1997) of varswaterskilpaaie (*C. chelonius* Baker, 1983) in Afrika beskikbaar is nie.

Ons studie lewer slegs een spesie van *Batrachocamallanus* op, wat ons vermoë om gevolgtrekkings oor die status van die genus te maak, seer beperk. Beide die opinies van Jackson & Tinsley (1995b) en Moravec *et al.* (2006) is op die morfologiese eienskappe van die nematode gebaseer. Onlangse molekulêre studies van verskillende groepe van nematode het vasgestel dat morfologiese eienskappe (in die besonder apomorfieë) onafhanklik in verskillende stamlyne kan opduik en is dus dikwels nie vir filogenetiese studies geskik nie (Carreno & Nadler, 2003; Tkach *et al.*, 2014). Derhalwe, is ons van mening dat die ware filogenie en evolusionêre verwantskappe tussen Camallanidae en hulle gashere in verdere molekulêre studies van meer spesies vanuit meer gashere regoor die wêreld aan die lig gebring sal word.



Hoofstuk 3

Xenopus laevis as UberXL vir nematode

3.1 Inleiding

Biologiese indringing, oftewel die verplasing van diere, plante en patogene na nuwe habitatte, dikwels met menslike hulp, is een van die onmiskenbare eienskappe van die Antroposeen (Capinha *et al.*, 2015; Ellis *et al.*, 2012). In verskeie gevalle word afnames in biodiversiteit direk aan die verspreiding van hoogs mededingende, generalis-indringerspesies gekoppel (Bellard *et al.*, 2016; Ricciardi, 2007) en baie indringerspesies het 'n negatiewe impak op hulle nuwe ekosisteme (Simberloff, 2011).

In die besonder word die rol van indringerspesies in die wysiging van parasietdinamiek in hulle nuwe habitatte gereeld misgekyk (Blackburn & Ewen, 2017). Daarteenoor kan ingevoerde gashere die versterking van inheemse parasietdinamiek tot gevolg hê deur as reservoirs vir inheemse parasiete op te tree wat op die ou end na inheemse gashere terugspoel, of in teenstelling daarmee kan hulle hierdie interaksies verflou deur as doodloopspunt vir inheemse parasiete op te tree (Telfer & Bown, 2012). Hierdie rimpels kan verskeie skakels verder af met die voedselketting gevoel word, veral in die geval van parasiete wat via trofiese interaksies oorgedra word (Amundsen *et al.*, 2013).

Die wêreldwye indringer, die gewone platanna *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae), is een van die wêreld se mees wydverspreide indringeramfibieë. Sy mensbemiddelde gebiedsuitbreiding het in die 1930's deur sy gebruik as 'n biologiese swangerskapstoets en 'n modeldier vir navorsing begin en is later deur die troeteldierhandel aangehelp (Gurdon & Hopwood, 2000; van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Tans strek sy vreemde gebied oor vier kontinente, met gevestigde bevolkings hoofsaaklik in areas met 'n Mediterreense klimaat (Lobos & Measey, 2002; Measey *et al.*, 2012). Nogtans maak

klimaat- en nismodellering dit duidelik dat *X. laevis* steeds heelwat potensiële omgewings regoor die wêreld kan vul (Ihlow *et al.*, 2016; Measey *et al.*, 2012; Rödder *et al.*, 2017; van Sittert & Measey, 2016). Saam met sy status as wêreldwye indringer, toon *X. laevis* boonop nog herhalende gebiedsuitbreiding in sy natuurlike gebied (Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017). Hierdie plaaslike indringings is deur sy gereelde verplasing vir navorsings- en opleidingsdoeleindes in die verlede meegebring (van Sittert & Measey, 2016) en word in die hede deur natuurlike verspreiding via oorlandse beweging en mensgemaakte waterliggame voortgesit (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2004, 2016; Measey *et al.*, 2012).

Die parasietfauna van *X. laevis* is grondig bestudeer sedert die vroeë 1900's, met meer as 25 parasietgenera, verteenwoordigend van alle invertebraatparasietgroepe behalwe die stekelkopwurms, wat in assosiasie met hierdie gasheer in sy natuurlike gebied beskryf is (Tinsley, 1996). Hoewel die parasietgemeenskappe van indringer-*X. laevis* beduidend verarm is (Schoeman *et al.*, 2019), is ten minste drie van sy koëvolueerde parasiete koïngevoer regoor die vreemde gebied (Jackson & Tinsley, 2001a; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014; Schoeman *et al.*, 2019; Tinsley & Jackson, 1998b). Dié is die monogeneërs *Protopolystoma xenopodis* Price, 1943 en *Gyrdicotylus gallieni* Vercammen-Grandjean, 1960 en die lintwurm *Cephalochlamys namaquensis* Cohn, 1906 (sien Schoeman *et al.*, 2019).

Gasheer-spesifieke parasiete met komplekse lewensiklusse skitter in hulle afwesigheid in die versameling van begeleidende parasiete (Schoeman *et al.*, 2019). Daarteenoor is dit veral die Digenea en Nematoda wat inheems tot die vreemde gebied van *X. laevis* is wat daarin geslaag het om nuwe gasheer-parasiete-assosiasies met die nuwe indringer te vorm (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014; Schoeman *et al.*, 2019).

In die geval van nematode het Kuperman *et al.* (2004) onvolwasse stadia van *Contracaecum* Rialet *et* Henry, 1912 (Ascaridoidea: Anasakidae) vanuit die liggaamsholte en *Eustrongylides* Jägerskiöld, 1909 (Dioctophymatoidea: Dioctophymidae) vanuit die onderhuidse weefsel van die indringerbevolking van *X. laevis* in Kalifornië gerapporteer. Insgelyks is larwe van *Contracaecum* ook teen baie lae infeksievlakke ingekapsel in die intestinale wand van *X. laevis* wat in Chili indringers is, gevind (Castillo *et al.*, 2017). Beide stelle outeurs het voorgestel dat die inheemse parasietfauna van Kalifornië en Chile die bron van hierdie infeksies was, omdat geeneen van hierdie parasiete al in assosieasie met *X. laevis* in suidelike Afrika gemeld is nie (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004).

In die natuurlike gebied weer is die Nematoda die tweede mees spesieryke takson, naas die Digenea, onder die parasiete van *X. laevis* (Tinsley, 1996). Onder hierdie geledere behoort drie spesies aan die familie Camallanidae (Camallanoidea), met name *Batrachocamallanus slomei* (Southwell *et* Kirshner, 1937), *Camallanus kaapstaadi* Southwell

et Kirshner, 1937 en *Camallanus xenopodis* Jackson *et* Tinsley, 1995. Hierdie spesies word regoor Afrika in *Xenopus* spp. aangetref (Avery, 1971; Jackson & Tinsley, 1995a,b; Kung, 1948; Southwell & Kirshner, 1937; Svitin *et al.*, 2018; Thurston, 1970; Tinsley *et al.*, 1979; Yeh, 1960a) en *C. kaapstaadi* is boonop in krokodilagtiges, wat deur na-sikliese parasitisme geïnfekteer is, gevind (Junker *et al.*, 2019). Nog 'n beskryfde nematode is *Pseudocapillaroides xenopi* Moravec *et* Cosgrove, 1982 (Enoplida: Capillariidae), waarvan al die lewenstadie die huid *X. laevis* infesteer (sien Brayton, 1992; Cohen *et al.*, 1984; Cosgrove & Jared, 1974, 1977; Feldman & Ramirez, 2014; Moravec & Cosgrove, 1982; Stephens *et al.*, 1987; Wade, 1982).

'n Paar verslae van onuitgekende nematode wat in assosiasie met *X. laevis* regoor sy natuurlike gebied beskryf is, het oor die jare opgeduik. Dit het gewissel van 'n enkele eksemplaar van vermoedelik *Rhabdias* Stiles *et* Hasal, 1905 (Rhabditoidea: Rhabdiasidae) in die long (Cosgrove & Jared, 1974), twee nematoodspesies van die Quimperiidae (Ascaridoidea: Quimperiidae) in die intestinum (Thurston, 1970), tot onuitgekende nematode wat in die liggaamsweefsel geënsisteer is (Cosgrove & Jared, 1974). Larwale nematode is ook in die glomerulêre ruimte aangeteken (Brayton, 1992; Cosgrove & Jared, 1974). Hierdie berigte, hoewel raar, gee te kenne dat *X. laevis* as 'n parateniese of intermediêre gasheer vir sommige nematode in sy natuurlike gebied kan optree, 'n rol wat dit reeds in die vreemde gebied vervul.

Ten gevolge van die deurdringende effekte van trofies oordraagbare parasiete in biologiese indringing (Amundsen *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2012; Roy & Lawson Handley, 2012), is dit van groot belang om die rol van *X. laevis* in die parasietdinamiek van sy natuurlike ekosisteme te verstaan. Met hierdie doel voor oë, as deel van 'n groter parasitologiese opname van *X. laevis* oor sy hele natuurlike gebied, bied die huidige studie die eerste berig van sewe nematoodspesies wat hierdie gasheer in Suid-Afrika parasiteer, aan. Kort morfologiese beskrywings, ondersteun deur mikrofoto's en molekulêre data (*18S* en *28S rRNA* en die *COX1*-geenvolgordes), tesame met verspreidingsdata, word vir toekomstige gebruik in die natuurlike gebied en verder verskaf. Verder word moontlike roetes van parasietoordrag op basis van 'n literatuuropname verken.

3.2 Metodes

In totaal is 181 volwasse individue in tregterfuike met hoenderleweraas vanaf 28 liggings regoor Suid-Afrika vanaf Maart 2017 tot April 2019 versamel (sien Bylaag A vir breedvoerige inligting oor al die vindoorde). Die paddas is in 6% etiel-3-aminobensoaat metaansulfonaat (MS222) (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) verdoof en daarna met 'n murgsteek gedood, volgens internasionaal aanvaarde standaardwerkprosedures. Vir die uitwendige parasietondersoek is die epidermis, sylyn, oë, mondholte, oor-keel-buise

en neusgate bekyk. Daarop is die liggaam in die lengte oopgesny en is die spysverteringskanaal, nier, uitskeidingsblaas, galblaas met -buisies, lewer, longe, hart en geslagsorgane verwyder en afsonderlik met 'n stereomikroskoop in 0.6% amfibieërsoutoplossing, volgens Ringer se metode voorberei (du Preez & van Wyk, 2007), bekyk vir inwendige parasiete. Die herwonne nematode is in die soutoplossing gewas, in 70% warm etanol gefikseer en toe in 70% etanol gestoor.

Voordat die nematode onder die mikroskoop ondersoek is, is hulle in gedistilleerde water vir omtrent 20 min geplaas en daarna in laktofenol vir enigiets tussen 30 min en 24 ure, afhangende van die grootte van die onderskeie nematode, verhelder. Die morfologie van die nematode is bestudeer en mikrofoto's is met ZEISS Axio Z1, Nikon AZ100, Nikon E800 en Nikon ECLIPSE Ni saamgestelde mikroskope geneem. Afmetings is met die hulp van die sagteware ZEN (blou uitgawe) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Duitsland) en NIS-Elements Documentation *weergawe* 3.22.09 (Nikon Instruments Geïnk., Tokio, Japan) geneem. In totaal is twee uit nege *Capillaria* sp. Zeder, 1800, wyfies, nege uit 183 *Contracaecum* sp. larwe, sewe *Falcaustra* sp. Lane, 1915 (drie wyfies en vier mannetjies), twee uit vier *Paraquimperia* sp. Baylis, 1934, larwe, vier uit nege *Tanqua* sp. Blanchard, 1904, larwe, 14 uit ongeveer 1 035 onuitgekende nematoodlarwe sp. 1, en agt uit ongeveer 150 onuitgekende nematoodlarwe sp. 2 gemeet. Alle afmetings in die teks word in mikrometers gegee, tensy dit anders gemeld word, en as reikwydtes, gevolg deur gemiddelde waardes tussen hakies, weergegee. Vir molekulêre studies is die middelfragmente van die eksemplare gebruik, terwyl die taksonomies belankrike voor- en agterpunte vir die morfologiese uitkenning van die spesie behou is.

DNA is deur die PCRBIO Rapid Extract PCR Kit (PCR Biosystems Bpk., Londen, Verenigde Koninkryk) geëkstraheer. Sitochroom-c-oksidase subeenheid I (*COX1*) kopieë is met die voorvoerderpaar 'LC01490' (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') en 'HCO2198' (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') bekom (Folmer *et al.*, 1994). Die termosiklusseringsprofiel was as volg: 3 min denaturasie teen 94 °C, 20 siklusse van 94 °C vir 30 sek, 45 °C vir 30 sek, 72 °C vir 1 min en 40 siklusse van 94 °C vir 30 sek, 51 °C vir 1 min, 72 °C vir 1 min vir amplifikasie en laastens 72 °C vir 10 min vir verlenging. Die *18S rRNA* is deur die voorvoerderpaar 'F18ScF1' (5'-ACCGCCCTAGTTCTGACCGTAAA-3') en 'F18ScR1' (5'-GGTTCAAGCCACTGCGATTAAAGC-3'), met die volgende siklusseringsprofiel geamplifiseer: 5 min denaturasie teen 95 °C, 40 siklusse van 95 °C vir 30 sek, 58 °C vir 30 sek, 72 °C vir 1 min 30 sek vir amplifikasie, gevolg deur 'n verlenging van 7 min teen 72 °C (Lefoulon *et al.*, 2015). Die *28S rRNA* is deur die voorvoerderpaar 'LSU5' (5'-TAGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGCA-3') en 'LSU3' (5'-TAGAAGCTTCCTGAGGGAAACTTCGG-3') (Littlewood *et al.*, 1997) geamplifiseer, met die termosiklusseringsprofiel as volg: een aanvanklike stappie van 5 min teen 95 °C vir lang denaturasie; 35 siklusse van 1 min teen 95 °C vir denaturasie, 2 min teen 48 °C vir hibridisasie en 2 min teen 72 °C vir verlenging en een finale stappie van 10 min teen 72 °C vir finale verlenging (Verneau *et al.*, 2009). Vir suiwering en volgordebepaling is die PCR-produkte na 'n kommersiële

laboratorium gestuur (Inqaba Biotec, Pretoria, Suid-Afrika) wat die EXOSAP-protokol vir suiwering aangewend het (New England Biolabs Bpk., Massachusetts, Verenigde State). Volgordebepaling is deur BigDye® Terminator *weergawe* 3.1 Cycle Sequencing uitgevoer, met die ooreenstemmende voorvoerderpare wat vir die finale PCR gebruik is, op 'n ABI3500XL-analiseerder (Applied Biosystems™). Aangrensende volgordes is gemonteer en geredigeer in Geneious *weergawe* 9.0 (Biomatters Bpk., Auckand, Nieu-Seeland) en aan GenBank voorsien.

Voorkomsyfer, gemiddelde intensiteit van infeksie en gemiddelde veelheid is vir elke nematoodspesie by elke ligging waar te vinde was, bereken, *sensu* Bush *et al.* (1997). Alle toepaslike institusionele, nasionale en internasionale riglyne vir die aanhouding en gebruik van diere is onder die Noordwes-Universiteit-etiekgoedkeuringsnommer NWU-00380-16-A5-01 gevolg.

3.3 Resultate

In die loop van die huidige studie is sewe nematoodspesies in assosiasie met *X. laevis* by tien liggings regoor Suid-Afrika ontdek (Figuur 3.1). Sekere spesies, soos die geënsisteerde derdestadiumlarwe van *Contracaecum* sp., was nogal volop in die streek, terwyl ander infeksies meer gelokaliseerd was. Die onuitgekende tweedestadiumlarwe vanuit die longe het die hoogste veelheid en intensiteit van infeksie van alle spesies by al drie liggings waar dit voorgekom het, getoon (Tabel 3.1).

3.3.1 Nematoodbeskrywings

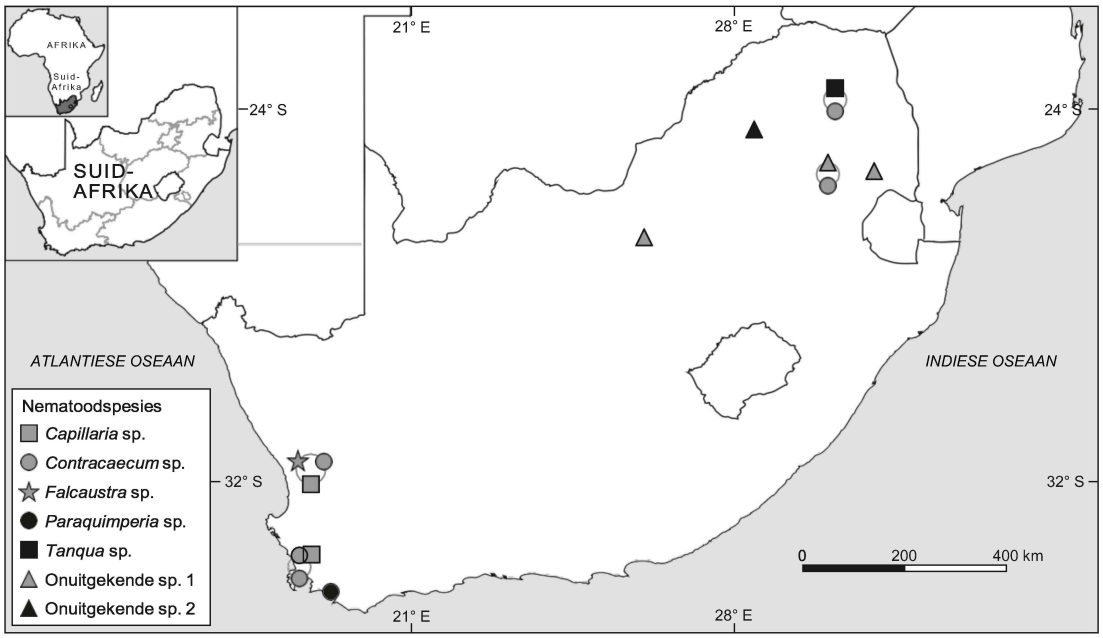
***Capillaria* sp.**

Infeksieplek: Maag, intestinum, rektum.

Verteenwoordigende DNA-volgorde: MN526255 (*28S*).

Figuur 3.2

Wyfie (morfometrie gebaseer op twee kroosdraende eksemplare). Liggam verleng, smal by voorste deel, verbreed na agter, 9.4–15.6 mm lank, 58–66 breed. Voor- en agterpunte gerond. Spierslukderm verleng, verbreed egalig na agterpunt, 272–324 lank. Stigosoom amper silindries oor hele lengte, 2.3–2.7 mm lank. Stigosiete breër as lank, met dikwels onopvallende ineensmeltings. Hele slukderm 2.7–3.0 mm lank. Senuweering omsingel slukderm by sy voorste helfte se vlak, 107–121 vanaf voorpunt van liggaam. Vulva voor ewenaar, met dik wande, 2.9–4.6 mm vanaf voorpunt van liggaam geleë, beslaan 29–31%



Figuur 3.1: Verspreiding van sewe voorheen onbeskryfde nematoodspesies wat by tien liggings regoor Suid-Afrika gevind is gedurende die parasitologiese sifting van *Xenopus laevis*. Die teenwoordigheid van meer as een nematoodspesie in gashere vanaf 'n enkele vindoord (Dullstroom, Vanrhynsdorp en Tzaneen), of vanaf twee nabygeleë vindoorde (in Kaapstad), word deur die kringvormige rangskikking van die simbole aangedui. Alle kaarte maak gebruik van die Mercator-projeksie en is in QGIS *version* 3.4.3 Madeira geskep.

van liggaamslengte. Vulva met 76–238 eiers, in een ry rangskik naby vulva en in drie rye agtertoe. Eiers 50 (41–54) lank, 23 (20–26) breed (n = 10). Intestinum reguit, smal, rektum kort, met dik wande. Stert kort, gerond, subterminaal.

Opmerkings

Onder die kapillariïed nematode is slegs *Pseudocapillaroides xenopi* in assosiasie met *X. laevis*, uitgevoer na Europa van Suid-Afrika, beskryf (Moravec & Cosgrove, 1982; Wade, 1982). Dié spesie is deur Moravec & Cosgrove (1982) as *Pseudocapillaroides xenopi* beskryf. In dieselfde jaar het Wade (1982) dit as *Capillaria xenopodis* beskryf. Hierdie twee name word afwisselend gebruik. Nietemin word *P. xenopi* as die meer algemeen aanvaarde naam gesien (Feldman & Ramirez, 2014), omdat die spesie duidelik aan 'n ander genus as *Capillaria* behoort op basis van filogenetiese en morfologiese bewyse. Verteenwoordigers van *Pseudocapillaroides* Moravec *et* Cosgrove, 1982 word deur die eiers met ontwikkelde larwe, klein liggaamsgrootte en die onderhuidse infeksieplek getipeer (Moravec & Cosgrove, 1982; Wade, 1982).

Verdere berigte van kapilariïede van Afrika is vanuit verskillende visspesies in die Clariidae en Cyprinidae regoor suidelike Afrika aangemeld. Nogtans word hierdie nematode in die meeste gevalle sonder beksrywings aangeteken, waar hulle net tot genusvlak uitgeken word (Boomker, 1994a; Moyo *et al.*, 2009). In ons materiaal is slegs vroulike eksemplare (waarvan twee goed ontwikkelde eiers bevat het) in die gasheer se intestinum gevind.

Tabel 3.1: Volledige vindoord- en infeksiedata, volgens Bush *et al.* (1997), van die sewe nematoodspesies wat vir die eerste keer vanaf die gewone platanna *Xenopus laevis*, afkomstig van tien vindoorde in Suid-Afrika, opgeteken is. Vindoorde word volgens plaasnaam, naaste dorp en provinsie aangedui. Waardes word as die gemiddeld vir 'n gegewe vindoord en spesie weergegee, met mediaan in blokhakies en reikwydte in ronde hakies. Locality names are given as farm name, nearest town and province.

Nematode	Vindoord	Koördinate	Aantal gashere	Intensiteit	Veel-heid	Voor-komsyfer
Capillaria sp.	7-Fontein-plaas, Vanrhynsdorp, Wes-Kaap	31°44'09.8"S; 18°49'31.7"E	7	2 [2] (1–2)	0.4	29%
	Loekiesfontein-plaas, Wellington, Wes-Kaap	33°34'16.9"S; 18°50'24.4"E	6	2 [1] (1–4)	0.8	38%
Contracaecum sp.	7-Fontein-plaas, Vanrhynsdorp, Wes-Kaap	31°44'09.8"S; 18°49'31.7"E	7	2 [2] (1–2)	0.4	29%
	Bloemendal Wynlandgoed, Kaapstad, Wes-Kaap	33°50'21.2"S; 18°36'01.0"E	5	3	0.6	20%
	Burgundy Landgoed, Kaapstad, Wes-Kaap	33°50'07.8"S; 18°33'10.1"E	14	5 [5] (4–6)	0.7	14%
	Crimson Creek Kersieplaas, Dullstroom, Mpumalanga	25°23'53.2"S; 30°02'16.9"E	10	3 [2] (1–8)	1.7	50%
	Letsitele, Tzaneen, Limpopo	23°47'55.7"S; 30°11'42.5"E	10	1	0.1	10%
Falcaustra sp.	7-Fontein-plaas, Vanrhynsdorp, Wes-Kaap	31°44'09.8"S; 18°49'31.7"E	7	2 [2] (1–3)	1.1	57%
Paraquimperia sp.	Hermanus, Wes-Kaap	34°22'12.6"S; 19°15'25.4"E	10	4	0.4	10%
Tanqua sp.	Letsitele, Tzaneen, Limpopo	23°47'55.7"S; 30°11'42.5"E	10	5 [5] (1–8)	0.9	20%
Onuitgekende nematoodlarwe sp. 1	Crimson Creek Kersieplaas, Dullstroom, Mpumalanga	25°23'53.2"S; 30°02'16.9"E	10	76 [76] (1–150)	15.1	20%
	Jacana Landgoed, Witrivier, Mpumalanga	25°20'20.7"S; 31°01'21.2"E	8	11 [11] (5–16)	2.6	25%
	Potchefstroom, Noordwes-Provinsie	26°45'19.7"S; 26°03'02.2"E	9	145 [30] (5–720)	112.7	78%
Onuitgekende nematoodlarwe sp. 2	Placidus-plaas, Modimolle, Limpopo	24°26'18.1"S; 28°26'12.8"E	6	150	25.0	17%

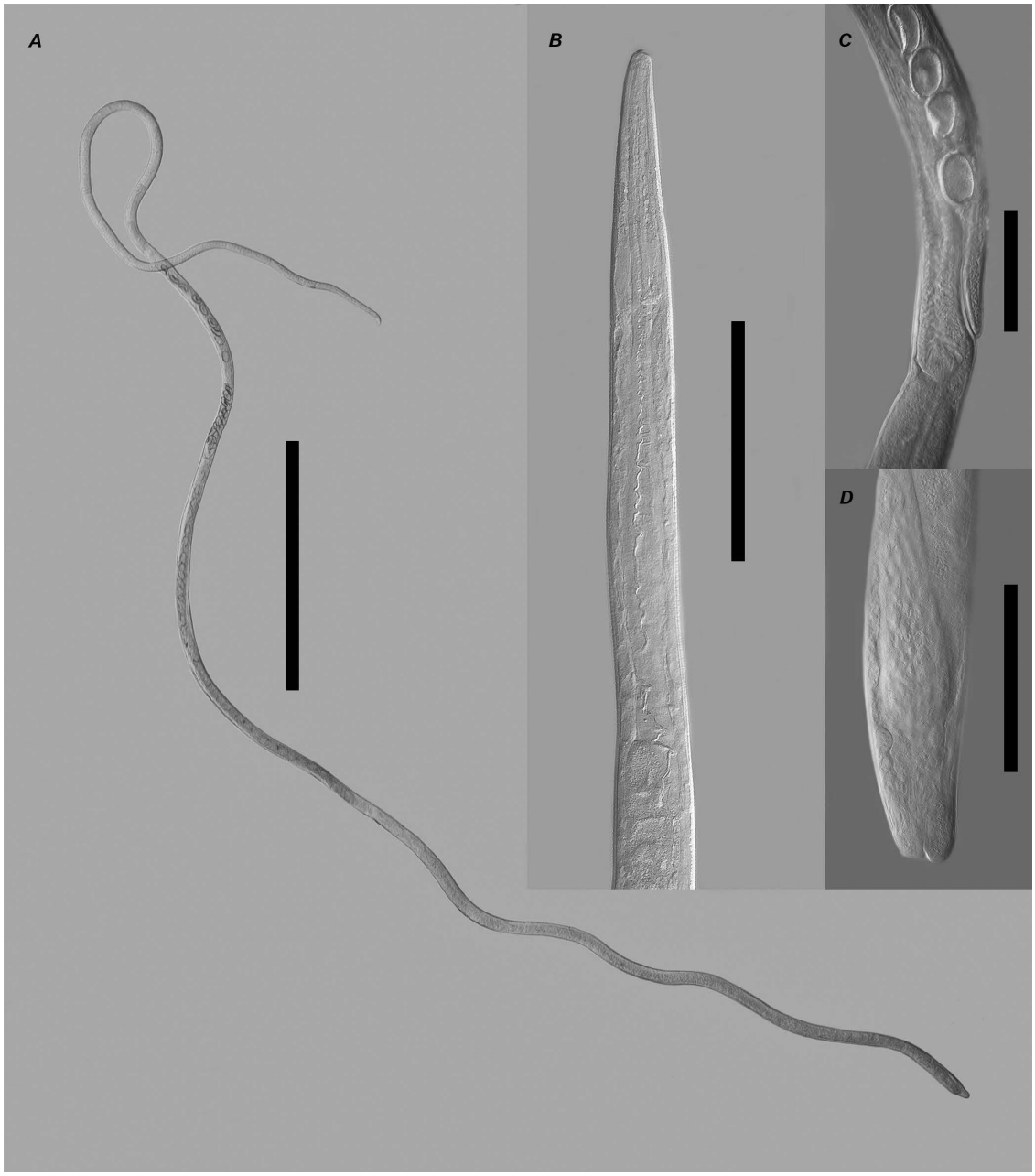
Op grond van die algemene liggaamsafmetings, die morulastadium van die eiers en die infeksieplek, tesame met molekulêre data, ken ons ons eksemplare aan die genus *Capillaria* toe. Ongelukkig, as gevolg van 'n afwesigheid van mannetjies en 'n gebrek aan duidelike molekulêre data, kon ons hulle nie tot op spesievlak uitken nie.

***Contracaecum* sp.**

> Infeksieplek: Gënsisteerd in die liggaamsholte en op die uitwendige oppervlak van die maag en lewer.
>
> Verteenwoordigende DNA-volgordes: MN526248 (*COX1*), MN526250 (*18S*), MN526256 (*28S*).

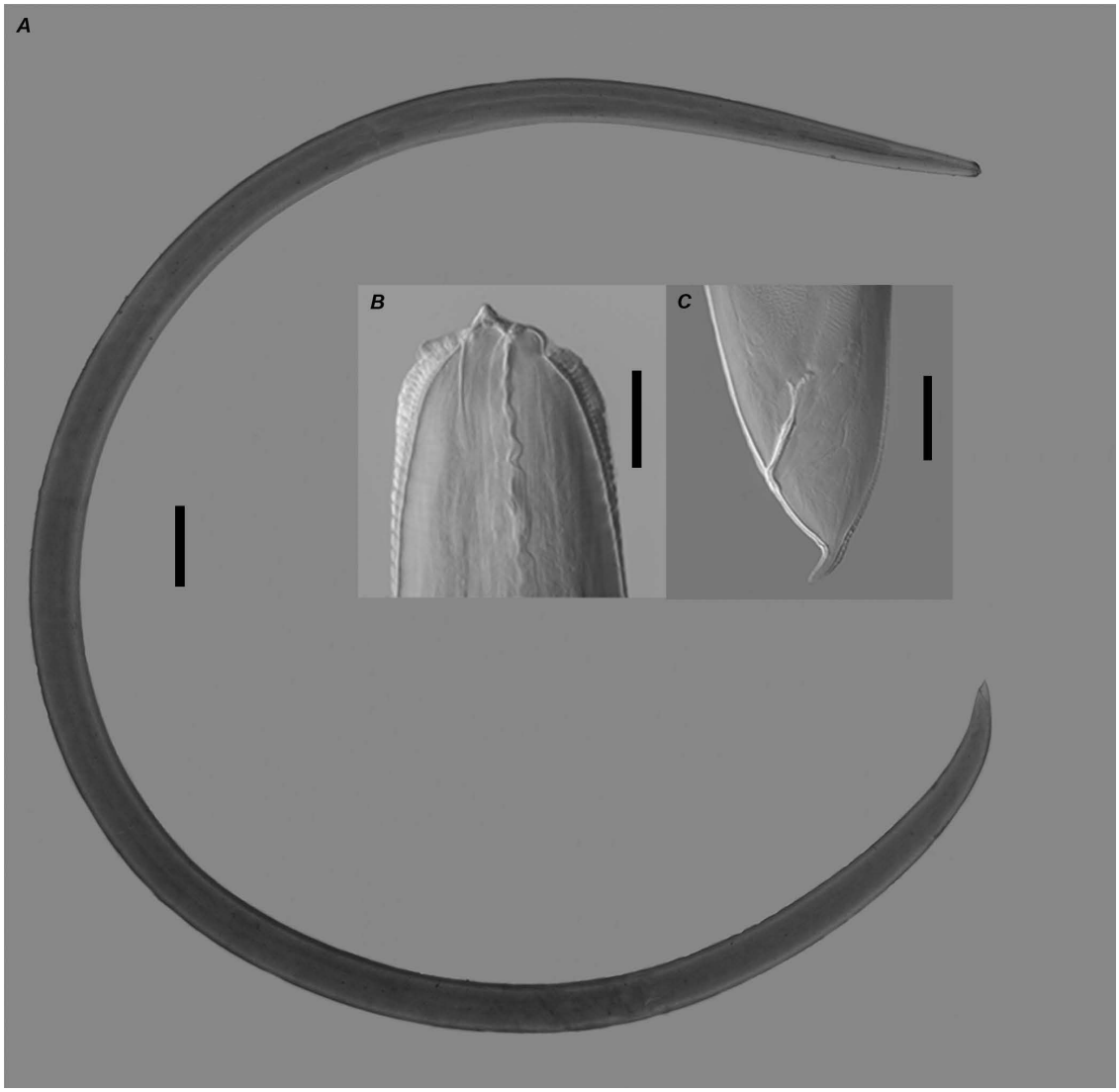
Figuur 3.3

Derdestadiumlarf (morfometrie gebasseer op nege eksemplare). Liggaam betreklik dik, robuust, 28–49 mm (42 mm) lank, 550–925 (810) breed. Kutikula langs hele liggaam



Figuur 3.2: Volwasse wyfie van *Capillaria* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **a** – algemene aansig; **b** – voorpunt van liggaam, syaansig; **c** – gedeelte van liggaam rondom vulva, syaansig; **d** – agterpunt van liggaam, syaansig. Skaalstawe: **a:** 1 mm; **b–d:** 100 μm

af, met opvallende dwarsgroewe. Voorpunt gerond, dra ventrale kutikulêre tandjie. Uitskeidingsporie naby tandjie geleë. Slukderm verleng, amper silindries in voorste helfte, verbreed na agter toe. Slukderm 2.8–3.5 mm (3.1) lank, 6.6–11.0% (8.0%) van liggaamslengte; onderskeidelik 77–116 (92), 106–192 (143) en 99–230 (180) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt. Senuweering omsingel slukderm by sy voorpunt se vlak, 363–547 (492) vanaf voorpunt van liggaam; 12–18% (16%) van slukderm se lengte. Intestinum reguit, smal. Rektum kort, met dik wande. Stert dun af, 135–247 (186) lank.



Figuur 3.3: Derde stadiumlarf van *Contracaecum* sp. geënsisteerd in *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **a** – algemene aansig; **b** – voorpunt van liggaam, syaansig; **c** – agterpunt van liggaam, syaansig. Skaalstawe: **a:** 1 mm; **b,c:** 100 μm

Opmerkings

Derdestadiumlarwe van *Contracaecum* is ingekapsel in die liggaamsholtes van verskeie visspesies regoor suidelike Afrika gevind: imberi *Brycinus imberi*, skerptandbaber *Clarias gariepinus* en stomptandbaber *C. ngamensis*, kanarie-kurper *Chetia flaviventris*, rooiborskurper *Coptodon rendalli*, karp *Cyprinus carpio*, papierbek *Enteromius mattozi*, direkol-ghieliemientjie *E. trimaculatus*, Afrika-greepvis *Hepsetus odoe*, tiervis *Hydrocynus vittatus*, grootskub-geelvis *Labeobarbus marequensis*, snawelvis *Marcusenius macrolepidotus*, grootbek-baars *Micropterus salmoides*, bloukurper *Oreochromis mossambicus*, driekolkurper *O. andersonii*, groenkop-kurper *O. macrochir*, Kaapse kurper *Sandelia capensis*, groen-happie *Sargochromis codringtonii*, silwerbaber *Schilbe intermedius*, olyfkurper *Serranochromis robustus*, perskop-grootbek *S. macrocephalus*, spikkel-skreeubaber *Synodontis nigromaculatus* en vleikurper *Tilapia sparrmanii* (sien Barson, 2004; Barson

& Avenant-Oldewage, 2006; Barson *et al.*, 2008; Boane *et al.*, 2008; Boomker, 1982, 1994a,b; Madanire-Moyo *et al.*, 2010; Mashego, 1989; Mashego & Saayman, 1981; Mbokane *et al.*, 2015; McHugh *et al.*, 2016; Moravec *et al.*, 2016; Moravec & van As, 2015; Moyo *et al.*, 2009; Sara *et al.*, 2014; Smit & Luus-Powell, 2012; Tavakol *et al.*, 2015; Whitfield & Heeg, 1977; van As & Basson, 1984). Tog het slegs Moravec *et al.* (2016) gedetailleerde beskrywings (met lynsketse en SEM-beelde) van *Contracaecum* sp. van die Kaapse kurper *S. capensis* van Suid-Afrika verskaf. Van die spesies van *Contracaecum* wat van Suid-Afrika bekend is, is slegs die geenfragmente van *C. ogmorhini* Johnston *et* Mawson, 1941 van die Kaapsepelsrob *Arctocephalus pusillus* beskikbaar op GenBank (Jabbar *et al.*, 2013; Nadler *et al.*, 2000; Shamsi *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2001). Omdat die derdestadiumlarwe van verskillende spesies van *Contracaecum* morfologies amper onuitkenbaar is en ons eksemplare duidelik van *C. ogmorhini* (KU558726) verskil in hulle *COX1*-volgordes (slegs 582 uit 689 bp is identies vir beide spesies), kon ons die herwonne eksemplare slegs tot op genusvlak uitken.

***Falcaustra* sp.**

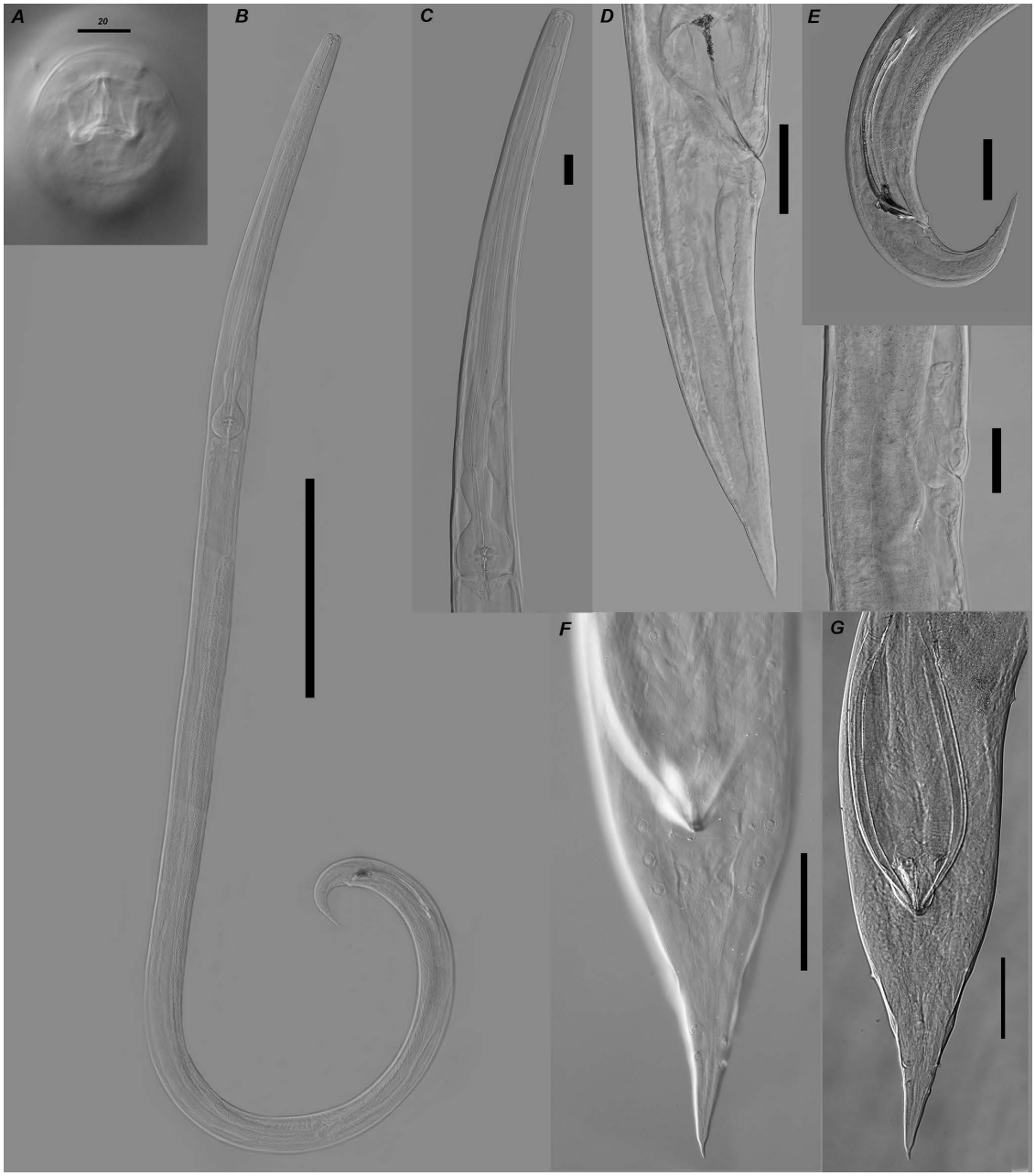
Infeksieplek: Intestinum en maag.

Volgordes kon nie vir hierdie spesie verkry word nie.

Figuur 3.4

Algemene beskrywing. Betreklike kort nematode, met maksimumbreedte by midlengte van liggaam. Toppunt: drie groot voorlabia, met twee kringe van papille (ses binne en ses buite), mondopening met geronde driehoekige vorm. Slukderm lank, bestaan uit kort voorste faringeale streek, lang silindriese liggaam, kort, effens uitgeswelde istmus en goed ontwikkelde agterbol. Senuweering omsingel slukderm by sy voorste kwart se vlak. Uitskeidingsporie by die slukdermbol se vlak. Stert dun af, met skerp punt in beide geslagte.

Mannetjie (morfometrie gebaseer op vier eksemplare). Liggaam 5.4–9.3 mm (7.3 mm) lank, 143–281 (197) breed. Slukderm 1.1–1.5 (1.3) lank, 16–21% (19%) van liggaamslengte; onderskeidelik 31–47 (37), 44–77 (62) en 110–159 (136) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering by 294–345 (321) van die voorpunt, 22–29% (24%) van slukderm se lengte. Uitskeidingsporie by 741–1193 (1038) vanaf voorpunt. Agterpunt van liggaam na onder gekrul. Spikule ewe, met skerp punte, 318–453 (380) lank. Gubernakel kort, verdun na agterpunt, 65–102 (84) lank. Stertpunt met papille: drie pare voor kloaak, een ongepaarde papil net voor kloaak, ses pare agter kloaak (drie pare subventrale papille voor kloaak plus twee subventrale pare naby stert se punt). Fasmiede by midlengte van stert se vlak. Stert dun af, 240–321 (285) lank.



Figuur 3.4: Volwasse *Falcaustra* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **a** – voorpunt van liggaam, mannetjie, vooraansig; **b** – mannetjie, algemene aansig; **c** – voorpunt van liggaam, mannetjie, syaansig; **d** – agterpunt van liggaam, mannetjie, syaansig; **e** – agterpunt van liggaam, wyfie, syaansig; **f** – gedeelte van liggaam rondom vulva, syaansig; **g,h** – agterpunt van liggaam, mannetjie, onderaansig. Skaalstaaf: **a:** 50 μm; **b:** 1 mm; **c–h:** 100 μm

Wyfie (morfometrie gebaseer op drie eksemplare). Liggaam 6.7–9.7 mm (8.3 mm) lank, 163–222 (191) breed. Slukderm 1.5–1.9 mm (1.6 mm) lank, 19–22% (20%) van liggaamslengte; onderskeidelik 41–57 (48), 65–72 (68) en 142–165 (152) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering by 370–390 (380) vanaf voorpunt, 21–25% (23%) van slukderm se lengte. Uitskeidingsporie 1110–1396 (1277) vanaf voorpunt. Vulva na ewenaar, 4.3–6.6 mm (5.5 mm) vanaf voorpunt, 64–68% (66%) van liggaamslengte.

Stert dun af, 355–489 (403) lank.

Opmerkings
Die ondersoekte eksemplare is aan die genus *Falcaustra* toegewys op basis van die teenwoordigheid van drie goed ontwikkelde labia en 'n gedifferensieerde slukdermbol met goed ontwikkelde kleppe (Anderson, 2000). Ons eksemplare verskil van meeste van die ander Afrika-spesies van *Falcaustra* wat van visse en varswaterskilpaaie beskryf is op grond van die afwesigheid van 'n skynsuier om die manlike stert (Baker, 1983; Moravec & Scholtz, 2017). Dieselfde parameter word van die drie visparasiterende spesies gemeld, naamlik *F. piscicola* (von Linstow, 1907), *F. verbekei* Campana-Rouget, 1961 en *F. therezieni* Petter, 1979 en van die twee spesies van amfibieë, met name *F. hinkeli* Jackson, 2000 en *F. puylaerti* Jackson, 2000 van *Xenopus* spp. (insluitend *X. laevis*) (Jackson, 2000). Die eksemplare in ons materiaal verskil van die laasgenoemde twee in metriese eienskappe, soos die grootte van die gubernakel (65–102 μm in *Falcaustra* sp. teenoor onderskeidelik 44–65 μm en 42 μm in *F. hinkeli* en *F. puylaerti*), lengte van die spikule (318–453 μm in *Falcaustra* sp. teenoor 151 μm in *F. puylaerti*) en lengte van die vroulike stert (350–489 μm in *Falcaustra* sp. teenoor 560–1060 μm in *F. hinkeli*) in wurms van vergelykbare grootte. *Falcaustra* sp. verskil ook duidelik van die visparasiterende spesies deur die aantal papille agter die kloaak: dit het ses pare, terwyl *F. piscicola* agt pare en *F. verbekei* en *F. therezieni* sewe pare het (Bursey *et al.*, 2018; Yorke & Maplestone, 1926). Ongeag die morfologiese verskille, verkies ons om nie 'n nuwe spesie te beskryf nie, maar ken eerder die herwonne eksemplare aan *Falcaustra* sp. toe omrede die beperkte monstergrootte en 'n gebrek aan kroosdraende wyfies.

***Paraquimperia* sp.**

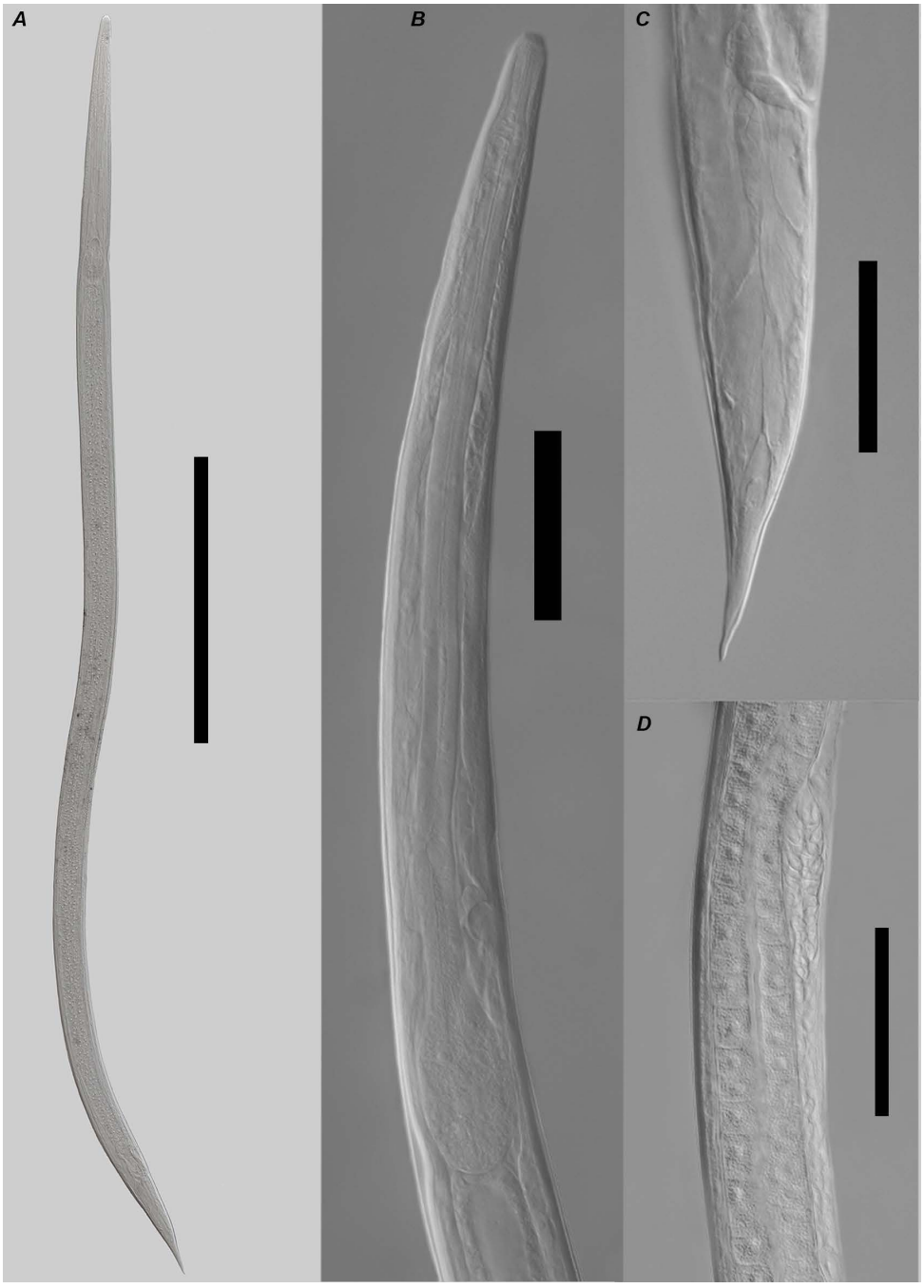
Infeksieplek: Intestinum.

Verteenwoordigende DNA-volgordes: MN526249 (*COX1*), MN526251 (*18S*), MN526257 (*28S*).

Figuur 3.5

Derdestadiumlarf (morfometrie gebaseer op twee eksemplare). Liggaam smal, verleng, 4.0–5.7 mm lank, 77–114 breed. Slukderm knuppelvormig, 416–712 lank, 7–18% van liggaamslengte; onderskeidelik 12–13, 21–25, 20–27 en 52–69 breed by voorpunt, voorste uitdying, midlengte en agterbol se vlak. Senuweering omsingel slukderm by voorste helfte, by 170–211 vanaf voorpunt van liggaam; 30–41% van slukderm se lengte. Uitskeidingsporie (opgespoor in een eksemplaar) by 436 vanaf voorpunt van liggaam. Genitaalprimordium klein, by midliggaamstreek geleë. Stert kort, dun af, 218–290 lank.

Opmerkings



Figuur 3.5: Derde stadiumlarf van *Paraquimperia* sp. vanaf die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **a** – algemene aansig; **b** – voorpunt van liggaam, syaansig; **c** – agterpunt van liggaam, syaansig; **d** – gedeelte van liggaam rondom genitaalprimordium, syaansig. Skaalstawe: **a:** 1 mm; **b–d:** 100 μm

Die herwonne eksemplare stem met *Paraquimperia africana* (JF803925) in 99% van hulle *18S rRNA*-fragmente ooreen (683 van 684 bp is identies vir beide spesies) (Moravec, 2007). Tans sluit die genus *Paraquimperia* slegs drie spesies in, gevind in die intestinum van palings en ook vanaf verskeie visse in die Cyprinidae en Percidae beskryf (Baylis, 1934; Cone *et al.*, 1993; Gupta & Bakshi, 1984; Hanek & Molnar, 1974; Hanek & Threlfall, 1970; Ivashkin & Khromova, 1976; Jackson, 1978; Karve, 1941; Køie, 1988; Lin *et al.*,

2015; Marcogliese & Cone, 1996; Moravec, 1966a,b, 1994, 2007; Moravec *et al.*, 2000; Mueller, 1934; Naidu, 1983; Nie & Kennedy, 1991; Saraiva & Chubb, 1989; Sasal *et al.*, 2008; Šrámek, 1901; Thielin *et al.*, 2007; Yamaguti, 1961). Die enigste spesie wat vanaf Afrika beskryf is, is *P. africana* Moravec, Boomker *et* Taraschewski, 2000 (Jackson, 1978; Moravec *et al.*, 2000). Omdat *18S rRNA* behoue bly, is 'n verskil in net een nukleotied in 'n betreklike kort fragment tekenend van interspesifieke status. Daarom, totdat verskeie volgordes van verskillende gene van verskillende spesies verkry is, verkies ons om die herwonne eksemplare aan *Paraquimperia* sp. toe te ken.

***Tanqua* sp.**

Infeksieplek: Geënsisteerd in die intestinum.

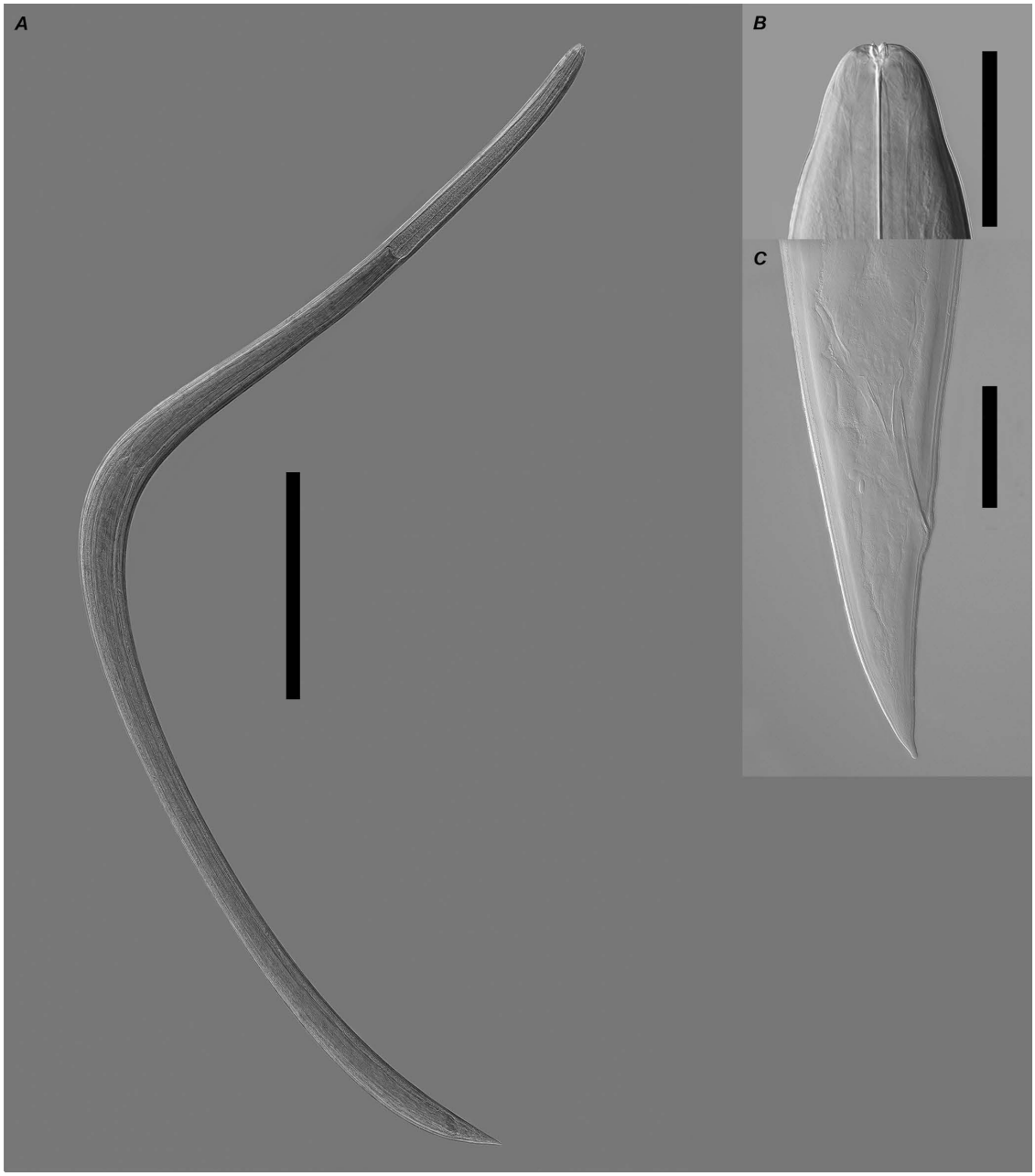
Verteenwoordigende DNA-volgordes: MN526252 (*18S*), MN526258 (*28S*).

Figuur 3.6

Derdestadiumlarf (morfometrie gebaseer op vier eksemplare). Liggaam smal, verleng, met maksimumbreedte by midlengte se vlak. Liggaam 8.8–10.8 mm (10.0 mm) lank, 281–315 (292) breed. Voorpunt met twee piepklein skynlabia, bereik mekaar nie. Slukderm verleng, verbreed egalig na agterpunt, 2.6–3.0 mm (2.8 mm) lank, 27–30% (28%) van liggaamslengte; onderskeidelik 37–47 (41), 79–137 (117) en 153–203 (174) breed by voorpunt, midlengte en agterpunt se vlak. Senuweering omsingel slukderm by sy voorpunt, 294–338 (316) vanaf voorpunt, 11–11% (11%) van slukderm se lengte. Uitskeidingsporie 372–443 (411) vanaf voorpunt geleë, 4–4% (4%) van liggaamslengte. Stert kort, dun af, met geronde punt, 162–197 (180) lank.

Opmerking

Verteenwoordigers van die genus *Tanqua* is in die besonder parasiete van verskeie spesies van *Varanus*-likkewane. Slegs *Tanqua tiara* (von Linstow, 1879) is al voorheen van Suid-Afrika vanuit *V. albigularis* en *V. ornatus* gemeld (Baylis, 1939; Hering-Hagenbeck & Boomker, 2000; Leiper, 1908; von Linstow, 1879). 'n Naasbestaande van *T. tiara*, 'n moontlike kongeneriese spesie, gebaseer op Bayes-inferensie van filogenie, is voorheen al as geënsisteerde derdestadiumlarf in die swemblaas van die geelbekpaling *Anguilla mossambica* in die Oos-Kaap in Suid-Afrika gevind (Laetsch *et al.*, 2012). Die gedeeltelike *28S rRNA*-volgorde (JF805627) van hierdie eksemplaar is identies (702 uit 702 bp) aan die ooreenstemmende basispare van ons effense langer *28S rRNA*-volgorde (990 bp), maar geen morfologiese beskrywing of taksonomiese uitkenning word deur die outeurs verskaf nie (Laetsch *et al.*, 2012). Boonop verskil ons versamelde eksemplare in minder as 1% (een uit 681 bp) van hulle *18S rRNA*-fragmente van *T. tiara* (JF934728), deur dieselfde outeurs gemeld vanaf *Varanus indicus* in Australië (Laetsch *et al.*, 2012). Nietemin, op grond van die betreklik kort beskikbare fragment van *18S rRNA* en sy hoë vlak van

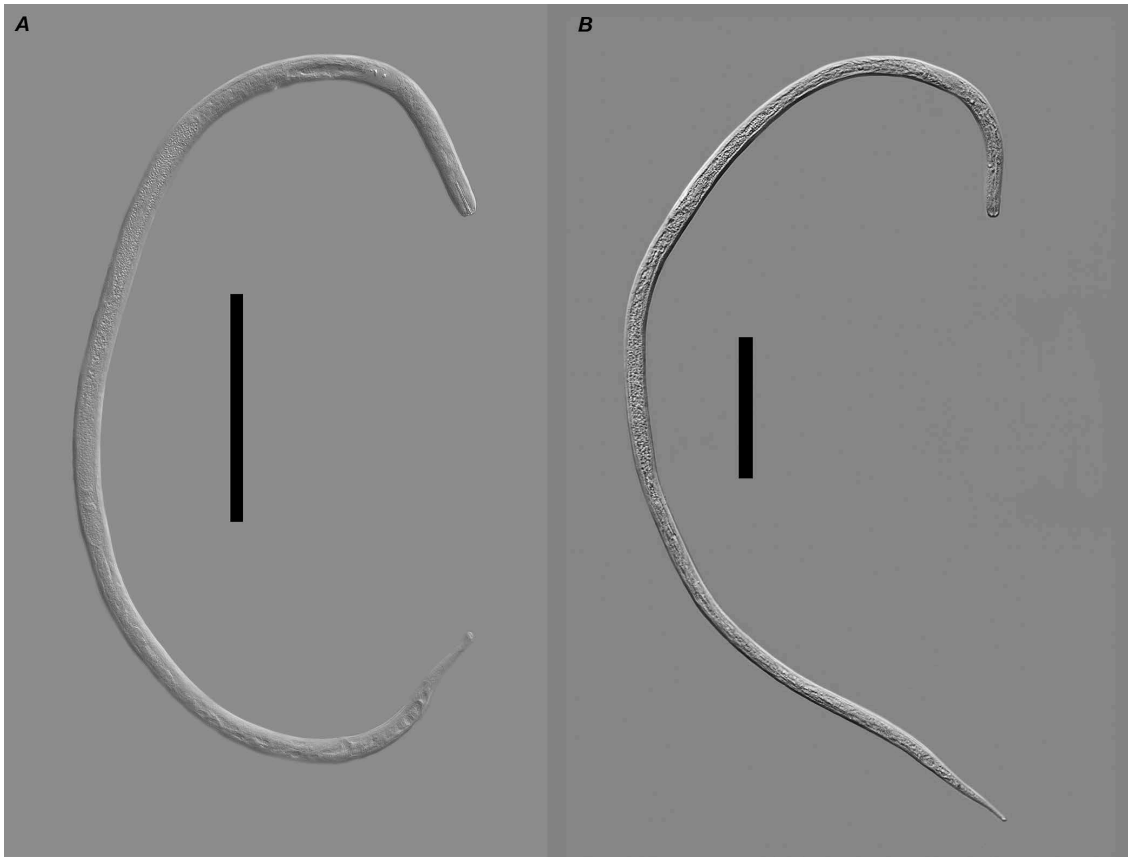


Figuur 3.6: Derde stadium larf van *Tanqua* sp. vanuit die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **a** – algemene aansig; **b** – voorpunt van liggaam, syaansig; **c** – agterpunt van liggaam, syaansig. Skaalstawe: **a:** 1 mm; **b,c:** 100 μm

behoudendheid, tesame met die feit dat ons slegs larwale stadia het, verkies ons om ons eksemplare as *Tanqua* sp. uit te ken.

Onuitgekende nematoodlarf sp. 1

Infeksieplek: Longe en lewer.



Figuur 3.7: a – Onuitgekende tweede stadium nematoodlarf sp. 1 vanuit die longe en lewer van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. **b** – Onuitgekende tweede stadium nematoodlarf sp. 2 vanuit die niere van *Xenopus laevis*, mikrofoto's. Skaalstawe: **a,b:** 100 μm

Verteenwoordigende DNA-volgorde: MN526253 (*18S*).

Figuur 3.7a

Tweedestadiumlarf (morfometrie gebaseer op 14 eksemplare). Piepklein nematode, liggaam smal, verleng, 530–619 (583) lank, 12–14 (13) breed by midlengte se vlak. Stoma verleng, silindries, 13–18 (15) lank. Slukderm smal, slukderm-intestinum-verbinding swak sigbaar. Genitaalprimordium nie gevind nie. Stert kort, met geronde punt, 14–32 (24) lank.

Onuitgekende nematoodlarf sp. 2

Infeksieplek: Niere.

Verteenwoordigende DNA-volgorde: MN526254 (*18S*).

Figure 3.7b

Tweedestadiumlarf (morfometrie gebaseer op agt eksemplare). Piepklein nematode, liggaam smal, verleng, 665–921 (800) lank, 13–17 (15) breed by midlengte se vlak. Stoma verleng, silindries, 7–14 (9) lank. Slukderm smal, slukderm-intestinum-verbinding swak sigbaar. Senuweering 45–69 (60) vanaf voorpunt. Genitaalprimordium nie gevind nie. Stert kort, dun af, met geronde punt.

Opmerkings vir onuitgekende sp. 1 en 2
Twee verskillende spesies van larwe is onderskeidelik van die longe en niere herwin. Die waargenome verskille in morfologiese eienskappe (liggaamslengte, stomalengte) en die infeksieplekke word deur die molekulêre data van die *18S rRNA*-volgordes (94.6% paarsgewyse identiteit) bevestig. Nietemin, BLAST-soekery (Altschul *et al.*, 1990) plaas beide spesies naby aan nematode van die familie Thelastomatidae en die genera *Blattophila* Cobb, 1920 en *Travassosinema* (Rao, 1958). Verteenwoordigers van hierdie taksa word gewoonlik in geleedpotiges (insekte en veelpotiges) gevind. Beide spesies is in hoë getalle in organe buite die spysverteringstelsel gevind, dus is na-sikliese of toevallige infeksie onwaarskynlik. Ons is van mening dat hulle netsowel 'n primitiewe spesie van nematode wees wat *X. laevis* as 'n parateniese of tussengasheer gebruik.

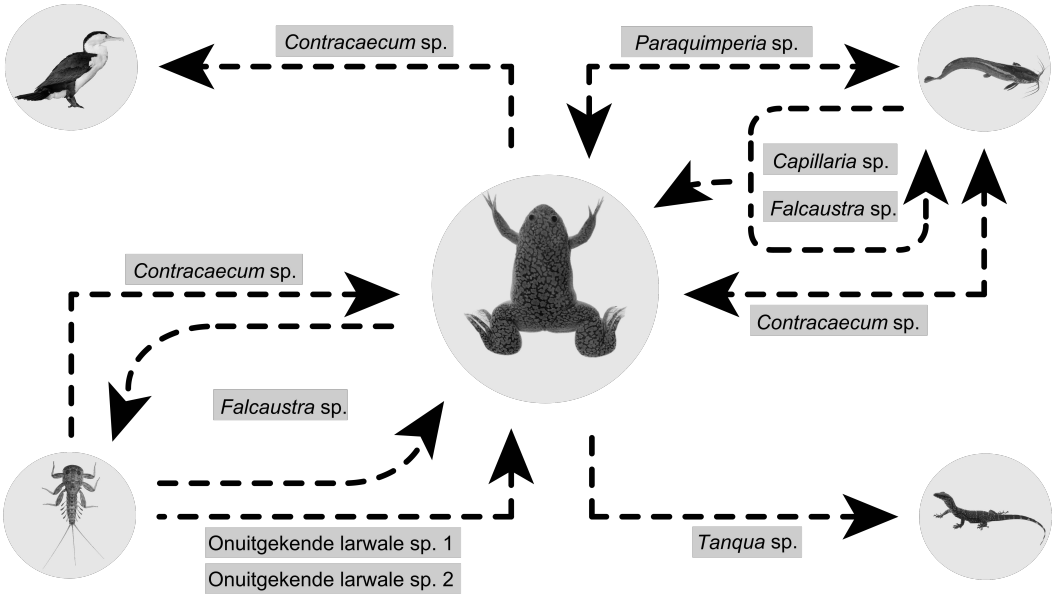
3.3.2 Rol van *Xenopus laevis* in die oordrag van nematoodspesies

Uit die sewe spesies van nematode wat oor berig word, word halfvolwasse en eierdraende wyfies van *Capillaria* sp. gevind; volwasse mannetjies en wyfies van *Falcaustra* sp.; derdestadiumlarwe van *Contracaecum* sp., *Paraquimperia* sp. en *Tanqua* sp.; en tweedestadiumlarwe van die onuitgekende larwe sp. 1 en onuitgekende larwe sp. 2. Na aanleiding van die beskikbare inligting oor die lewensiklusse, infeksieplekke en ontwikkelingstadia van die herwonne nematode, stel ons die rol wat *X. laevis* in hulle oordrag kon speel, voor (Figuur 3.8).

Beide direkte en indirekte lewensiklusse is al vir visparasiterende Capillariidae beskryf (Køie, 1988; Moravec *et al.*, 1987). Omdat die halfvolwasse en volwasse stadia in die intestinum gevind is, beskou ons *X. laevis* as 'n finale gasheer vir die herwonne *Capillaria* sp.

Derdestadiumlarwe van *Contracaecum* sp. is geënsisteerd op die oppervlak van die interne organe en in die liggaamsholte gevind, soortgelyk aan vorige bevindinge van hierdie nematode in visspesies (Moravec *et al.*, 2016). Dus beskou ons *X. laevis* as 'n tussengasheer en moontlike parateniese gasheer van *Contracaecum* sp.

As gevolg daarvan dat al die herwonne eksemplare van *Falcaustra* sp. volwassenes was en dat lede van hierdie genus gewoonlik van 'n tussengasheer tydens hulle lewensiklus gebruik maak (Skrjabin *et al.*, 1964), kan *X. laevis* die finale of minder waarskynlik 'n



Figuur 3.8: Voorgestelde trofiese transmissie in 'n varswaterekosisteem van die sewe nematoodparasiete wat in die huidige studie gevind is. *Xenopus laevis* (middel) tree as tussen- of parateniese gasheer op vir die larwale stadia van *Contracaecum* sp., *Paraquimperia* sp., *Tanqua* sp. en twee ander onuitgekende tweede stadium larwe en is 'n moontlike definitiewe gasheer vir die volwasse stadia van *Capillaria* sp. en *Falcaustra* sp. Ander gashere sluit in, van link bo in 'n kloksgewyse rigting, visvretende voels, visse, semi-akwatiese akkedisse en akwatiese invertebrate. Pylpunte wys na die predatoor.

parateniese gasheer vir hierdie nematode wees.

Derdestadiumlare van *Paraquimperia* sp. (bekend as 'n visparasiterende genus) is in die intestinum van die bestudeerde paddas gevind. 'n Gebrek aan inligting oor die lewensiklusse van hierdie nematode beteken dat *X. laevis* óf as 'n finale óf as 'n parateniese gasheer vir die herwonne *Paraquimperia* sp. kan optree.

Derdestadiumlarwe van *Tanqua* sp. is in siste in die intestinum van *X. laevis* opgespoor. Omdat die lewensiklus van hierdie genus nie goed bestudeer is nie, kan *X. laevis* die rol van parateniese of tussengasheer vir die herwonne *Tanqua* sp. vertolk.

Beide die onuitgekende larwale spesies is vry en in hoë getalle in bloedgevulde organe (longe en niere) gevind. Derhalwe gebruik hierdie spesies *X. laevis* hoogs waarskynlik as 'n tussengasheer.

3.4 Bespreking

In totaal is ongeveer 1400 eksemplare van sewe spesies van nematode vanaf tien liggings regoor Suid-Afrika gevind wat *X. laevis* parasiteer. Die mees wydverspreide was die

geënsisteerde *Contracaecum* sp. derdestadiumlarwe, met ’n totaal van 183 eksemplare wat tussen 10 en 50% van die gashere by vyf bestudeerde liggings geparasiteer het. Die ander twee spesies wat ook as derdestadiumlarwe herwin is, naamlik vier eksemplare van *Paraquimperia* sp. en nege van *Tanqua* sp., is elk by een ligging opgespoor. Onder die volwasse eksemplate is nege vroulike *Capillaria* sp. vanaf gashere van twee liggngs in die Wes-Kaap herwin, terwyl drie wyfies en vier mannetjies van *Falcaustra* sp. vanaf een ligging in dieselfde area herwin is. Die eerste spesie van onuitgekende tweedestadiumlarwe was in baie hoë getalle (omtrent ’n duisend larwe in totaal) in die longe van die helfte van die gashere by drie liggings opgespoor. Daarteenoor is ongeveer 150 eksemplare van die tweede spesie van onuitgekende tweedestadiumlarwe in die nier van slegs een padda waargeneem.

Van al hierdie nematode is slegs verteenwoordigers van die genus *Contracaecum* al voorheen van *X. laevis* gerapporteer, nie in die natuurlike gebied nie, maar wel in Kalifornië en Chili (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004). Die ander ses spesies word vir die eerste keer vanuit *X. laevis* hier gemeld, alhoewel die moontlikheid van assosiasies met nematode in die natuurlike gebied al in vorige berigte aan die lig gebring is (Brayton, 1992; Cosgrove & Jared, 1974; Thurston, 1970). Hierdie verbasende hoë aantal nuwe parasietassosiasies word ten spyte van meer as 100 jaar van ondersoeke en etlike parasitologiese opnames van *X. laevis* sedert die vroeë 1900’s gemeld (Aisien *et al.*, 2004; Avery, 1971; Beverley-Burton, 1963; Bruňanská *et al.*, 2012; Cohn, 1906; Cosgrove & Jared, 1974; Crous & du Preez, 1997; de Puytorac & Grain, 1965; Dick, 1959; Dollfus, 1968; du Preez *et al.*, 1996; Elkan & Murray, 1952; Feldman & Ramirez, 2014; Ferguson & Appleton, 1988a,b; Fischthal & Thomas, 1968; Harris & Tinsley, 1987; Metcalf, 1923; Jackson & Tinsley, 1988, 1995a,b, 1997, 1998a,b, 2001a,b; King & van As, 1992, 1997, 2000; Kruger *et al.*, 1991; Kruger & du Preez, 2015; Mettrick, 1963; Macnae *et al.*, 1973; Manter & Pritchard, 1964; Moravec & Cosgrove, 1982; Nigrelli & Maraventano, 1944; Porter, 1938; Price, 1943; Pritchard, 1964; Sandon, 1941; Southwell & Kirshner, 1937; Svitin *et al.*, 2018; Theunissen *et al.*, 2014; Thurston, 1967, 1970; Tinsley, 1996; Tinsley & Sweeting, 1974; Tinsley & Whitear, 1980; Tinsley & Wynne Owen, 1975, 1979; Tinsley & Jackson, 1995, 1998a,b; Vercammen-Grandjean, 1960; Wade, 1982; Williams, 1959; Yeh, 1960a,b). Ons stel viir dat hierdie nuwe gasheer-parasiet-assosiasies ’n gevolg van volgehoue plaaslike uitbreiding (de Villiers & Measey, 2017; Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017) en doelbewuste verplasing (van Sittert & Measey, 2016) van *X. laevis* in sy natuurlike gebied kan wees, tesame met die onderverteenwoordiging van larwale stadia van nematode in hierdie padda in vorige ondersoeke.

Ongelukkig, as gevolg van ’n gebrek aan molekulêre data, afwesigheid van duidelike morfologiese beskrywings van larwale stadia en swak bestudeerde lewensiklusse van die herwonne nematode, kon ons nie een van die versamelde nematode tot op die spesievlak uitken nie en sommige nie eens tot op die familievlak nie. Inderdaad, selfs daardie eksemplare wat in hulle volwasse stadium herwin is, kon slegs tot op genusvlak

uitgeken word. Dit was die geval vir *Capillaria* sp. waarvan geen mannetjies beskikbaar was nie en *Falcaustra* sp. waarvan geen kroosdraende wyfies beskikbaar was nie. In die geval van die vyf spesies wat as tweede- of derdestadiumlarwe herwin is, is dit amper onmoontlik om larwale stadia van kongeneriese namatoodspesies sonder die toepassing van molekulêre hulpmiddels van mekaar te onderskei as gevolg van hoë vlakke van morfologiese soortgelykheid op hierdie ontwikkelingstadium (Anderson, 2000). Ongelukkig is daar baie min volgordes van nematoodspesies wat ektotermiese vertebrate vanuit Afrika parasiteer op GenBank en geen van dié wat wel beskikbaar is, het met die verkrygde volgordes van die nematodes van die huidige studie ooreengestem nie.

Daarbenewens, op basis van 'n gebrek aan inligting oor die lewensiklusse van Afrika-nematode in die algemeen, kan ons die presiese rol van *X. laevis* in die oordrag van die nematoodspesies wat hier herwin is, nie vaspen nie. Nietemin, met die beskikbare data oor nematoodlewensiklusse, verspreiding, infeksieplekke en gekose gasheertaksa van die streek voor oë, stel ons voor dat *X. laevis* 'n finale gasheer kan wees vir twee spesies (*Capillaria* sp. en *Falcaustra* sp.), 'n parateniese gasheer vir drie spesies (*Contracaecum* sp., *Paraquimperia* sp. en *Tanqua* sp.) en 'n tussengasheer vir vier spesies (*Contracaecum* sp., *Tanqua* sp. en beide spesies onuitgekende larwe). Hierdie bevindinge belig die sleutelrol van *X. laevis* in die parasietdinamiek van die varswaterekosisteme waarvan dit deelvorm. In verskeie gevalle blyk dit asof dit as gasheer optree vir nematode wat voorheen slegs met visse geassosieer is, soos wat verwag kan word van 'n amfibie met 'n hoofsaaklik akwatiese ekologie (Elephandt *et al.*, 2000). Dit word deur die vorige berigte van *Capillaria* sp. (Boomker, 1994a; Moyo *et al.*, 2009), *Contracaecum* sp. (Barson, 2004; Barson & Avenant-Oldewage, 2006; Barson *et al.*, 2008; Boane *et al.*, 2008; Boomker, 1982, 1994a,b; Madanire-Moyo *et al.*, 2010; Mashego, 1989; Mashego & Saayman, 1981; Mbokane *et al.*, 2015; McHugh *et al.*, 2016; Moravec *et al.*, 2016; Moravec & van As, 2015; Moyo *et al.*, 2009; Sara *et al.*, 2014; Smit & Luus-Powell, 2012; Tavakol *et al.*, 2015; van As & Basson, 1984; Whitfield & Heeg, 1977) en *Paraquimperia* sp. (Jackson, 1978; Moravec *et al.*, 2000) uitgebeeld, wat kom van varswatervisse in Afrika. Op die koop toe, voorheen onbeskryfte roetes van trofiese oordrag van nematode via *X. laevis* na visvretende voëls, in die geval van *Contracaecum* sp. (Barson, 2004; Whitfield & Heeg, 1977), en semi-akwatiese likkewane, in die geval van *Tanqua* sp. (Baylis, 1939; Hering-Hagenbeck & Boomker, 2000; Leiper, 1908; von Linstow, 1879), word voorgestel.

Kennelik, soos wat ook vir ander indringerspesies gewys is (Amundsen *et al.*, 2013; Dunn & Smyth, 2005; Roy & Lawson Handley, 2012), strek die moontlike effekte van *X. laevis* op varswater ekosisteme verder as direkte interaksies. Die huidige studie wys dat *X. laevis* 'n veelsydige parasietreservoir in sy natuurlike gebied is waar dit 'n bekende plaaslike eksoot is wat dikwels as pionier sy gebied uitbrei (Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017). Dit wysig moontlik die parasietdinamiek van nie net die nematode wat met ander amfibieë geassosieer word nie, maar ook dié van visse, reptiele, voëls en selfs invertebrate, wat uiteindelik trofiese interaksies op 'n groot skaal verander. Studies van die indringergebied

laat ’n soortgelyke rol in die nuwe habitatte van *X. laevis* deurskemer, waar dit klaarblyklik nuwe assosiasies met beide larwale nematode en digeneërs kan vorm (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014).

Vorige outeurs het gewaarsku dat ons in die duister oor die natuurlike ekologie van *X. laevis* bly tot afbreuk van sy bestuur elders (Measey *et al.*, 2012). Die huidige studie verskaf ’n voorbeeld van hoe dit sal uitspeel. Derdestadiumlarwe van *Contracaecum* is al vanuit *X. laevis* in die vreemde gebied by twee geleenthede opgemerk (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004). Nogtans, omdat daar geen rekords bestaan het vir *Contracaecum* geassosieer met *X. laevis* in die natuurlike gebied nie, is daar aangeneem dat die eksemplare vanuit die vreemde gebied hul oorsprong in die inheemse fauna van die vreemde gebied het. Of daar waarheid hierin steek sal waarskynlik slegs deur genoegsame molekulêre data en morfologiese beskrywings vasgestel kan word, waarvan daar in beide gevalle ’n tekort is vir *Contracaecum* in die natuurlike en vreemde gebiede.

Ons moenie die vêrreikende effekte van parasiete onderskat gedurende ondersoeke van die ekologie van indringerspesies nie. Dit is veral parasiete wat trofies oorgedra word, waarvan al die herwonne parasiete as voorbeelde dien, wat die meer prominente rol in die wysiging van netwerke na invoering speel (Amundsen *et al.*, 2013). Ingevoerde gashere kan versterking en verflouing van inheemse parasietdinamiek tot gevolg hê (Telfer & Bown, 2012). Die aankoms van ’n ander indringeramfibie in Australië, die reuse skurwepadda, word byvoorbeeld met verlaagde longwurmladings in inheemse paddas geassosieer omdat hulle as doodloopspunte vir natuurlike parasiete optree (Nelson *et al.*, 2015; Selechnik *et al.*, 2017).

Jammer genoeg is hierdie effekte nie bekend vir *X. laevis* nie, ’n indringeramfibie met ’n veel groter wêreldwye voetspoor as die reuse skurwepadda. As beginpunt om hierdie kennisgaping te vul, is die huidige studie ’n duidelike demonstrasie van die belang van die insluiting van molekulêre data, morfologiese beskrywings en kwalitatiewe beelde in parasitologiese opnames in Afrika, selfs wanneer daar oor larwale stadia verslag gedoen word. Origens moet toekomstige ondersoekers van *X. laevis* in sy vreemde gebied nie die onderliggende effekte van parasiete, beide koïndringers en nuwe assosiasies, utlaat wanneer die impak en voortspruitende bestuurstrategieë van hierdie wêreldwye amfibie bepaal word nie.



Hoofstuk 4

Herhaaldelike afname in parasietverskeidenheid in indringerbevolkings van *Xenopus laevis*: ’n wêreldwye eksperiment in vyandvrystelling

4.1 Inleiding

In die Antroposeen vind daar ongekende wysiging van die aarde se lewensomgewing plaas (Bar-On *et al.*, 2018; Ceballos *et al.*, 2015). Die toenemende omvang van die mensbemiddelde verskuiwing van diere, plante en patogene na nuwe omgewings het gelei tot groeiende belangstelling in die veld van indringerwetenskap (Richardson & Ricciardi, 2013). Sedert die ontstaan van moderne indringerekologie na aanleiding van Charles Elton se baanbrekersboek (1958) is verskeie hipoteses ontwikkel om die ongeëwenaarde sukses van indringerspesies te verklaar (Jeschke, 2014). As ’n geluk by die ongeluk bied die natuurlike eksperiment wat verrys vanuit die wêreldwye verspreiding van sekere indringerspesies, soos rotte en Australiese akasias, aan bewaringsgesindes die unieke geleentheid om evolusionêre en ekologiese hipoteses met behulp van onafhanklike geografiese replikate te toets (Morand *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2011a).

Een hipotese in indringerbiologie wat gereeld na verwys word, is die Vyandvrystellingshipotese (ERH). Dit skryf die sukses van indringerspesies aan die indringer se ontsnapping van die effekte van natuurlike vyande soos gekoëvolueerde parasiete tydens die proses van koïndringing toe (Keane & Crawley, 2002; Torchin & Mitchell, 2004). Die ERH word em-

piries ondersteun oor ‘n wye reeks van taksa, veral in terme van parasietverlies, wat geld vir die meerderheid van indringerspesies in hulle nuwe gebiede (Heger & Jeschke, 2014; Lui & Stiling, 2006; Torchin *et al.*, 2003; Torchin & Mitchell, 2004). Desnieteenstaande ly die geldigheid van die ERH as ‘n samebindende teorie in indringerekologie onder andere onder die tekort aan studies wat op ’n wêreldwye skaal uitgevoer word (Blackburn & Ewen, 2017; Lester *et al.*, 2015; Prior *et al.*, 2015; Prior & Hellmann, 2015; Schultheis *et al.*, 2015). Byvoorbeeld, in die geval van indringeramfibieë het die enigste twee studies wat tot op hede parasietverlies ondersoek het, gefokus op twee boompaddaspesies, *Eleutherodactylus coqui* en *Osteopilus septentrionalis*, wat beide inheems en indringers is tot Sentraal-Amerika (Marr *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2015). Om die waarheid te sê, relatief min studies het al die ERH in wêreldwyd verspreide spesies van enige klas ondersoek. Twee uitsonderings op hierdie stand van sake is die herhaaldelike parasietverlies wat in beide die Europese huismossie en die Europese groenkrap gedemonstreer is (Marzal *et al.*, 2011; Torchin *et al.*, 2001).

In die lig hiervan is die wêreldwye indringerpadda, *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae), met sy menige indringerbevolkings op vier kontinente, die ideale model om die ERH op ’n wêreldskaal te toets (Measey *et al.*, 2012). Hierdie spesie se uitbreiding vanuit suidelike Afrika na ander kontinente het in die 1930’s begin toe dit wydverspreid as ’n biologiese swangerskapstoets en later as ’n modelorganisme in navorsing en leer aangeneem is (Gurdon & Hopwood, 2000; Shapiro & Zwarenstein, 1934; van Sittert & Measey, 2016). Die wêreldwye gebiedsuitbreiding van *X. laevis* kon sedertdien nie gestuit word nie, met klimaatsverandering en ‘n ingeboude aanpasbaarheid tot nuwe omgewings as bydraende faktore tot verhoogde indringerpotensiaal in baie gebiede (Ihlow *et al.*, 2016; Rödder *et al.*, 2017; van Sittert & Measey, 2016). Daarbenewens, as ‘n plaaslike eksoot in die natuurlike gebied, word die indringervermoë van *X. laevis* nie net beperk tot bevolkings buite die natuurlike gebied nie (Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017). Sedert die aanvang van handel in hierdie padda, is *X. laevis* in die natuurlike gebied in groot getalle verplaas (van Sittert & Measey, 2016) en verdere gebiedsuitbreiding is sonder menslike bemiddeling deur oorlandse beweging via plaasdamme en mensgemaakte waterweë bewerkstellig (de Villiers & Measey, 2017; Fouquet & Measey, 2006; Measey, 2004, 2016; Measey *et al.*, 2012).

Boonop, die feit dat hierdie spesie se parasiete goed bestudeer is, maak *X. laevis* die ideale model om die ERH in terme van parasiete as natuurlike vyande te toets. Vanaf die beskrywing van sy eerste geassosieerde parasiet (Cohn, 1906), is oor die 20 metasoönparasietspesies met hom geassosieer in die natuurlike gebied (Avery, 1971; Beverley-Burton, 1963; Cosgrove & Jared, 1974; Crous & du Preez, 1997; Dick, 1959; du Preez *et al.*, 1996; Elkan & Murray, 1952; Ferguson & Appleton, 1988a,b; Fischthal & Thomas, 1968; Harris & Tinsley, 1987; Héritier *et al.*, 2015; Jackson & Tinsley, 1995a,b, 1997, 1998b, 2001a; King & van As, 1992, 1997, 2000; Kruger & du Preez, 2015; Macnae *et al.*, 1973; Manter & Pritchard, 1964; Moravec & Cosgrove, 1982; Nigrelli & Maraventano,

1944; Pritchard, 1964; Prudhoe & Bray, 1982; Southwell & Kirshner, 1937; Svitin *et al.*, 2018; Theunissen *et al.*, 2014; Thurston, 1967, 1970; Tinsley & Jackson, 1995; Tinsley & Whitear, 1980; van der Lande & Tinsley, 1976; Vercammen-Grandjean, 1960; Wade, 1981, 1982).

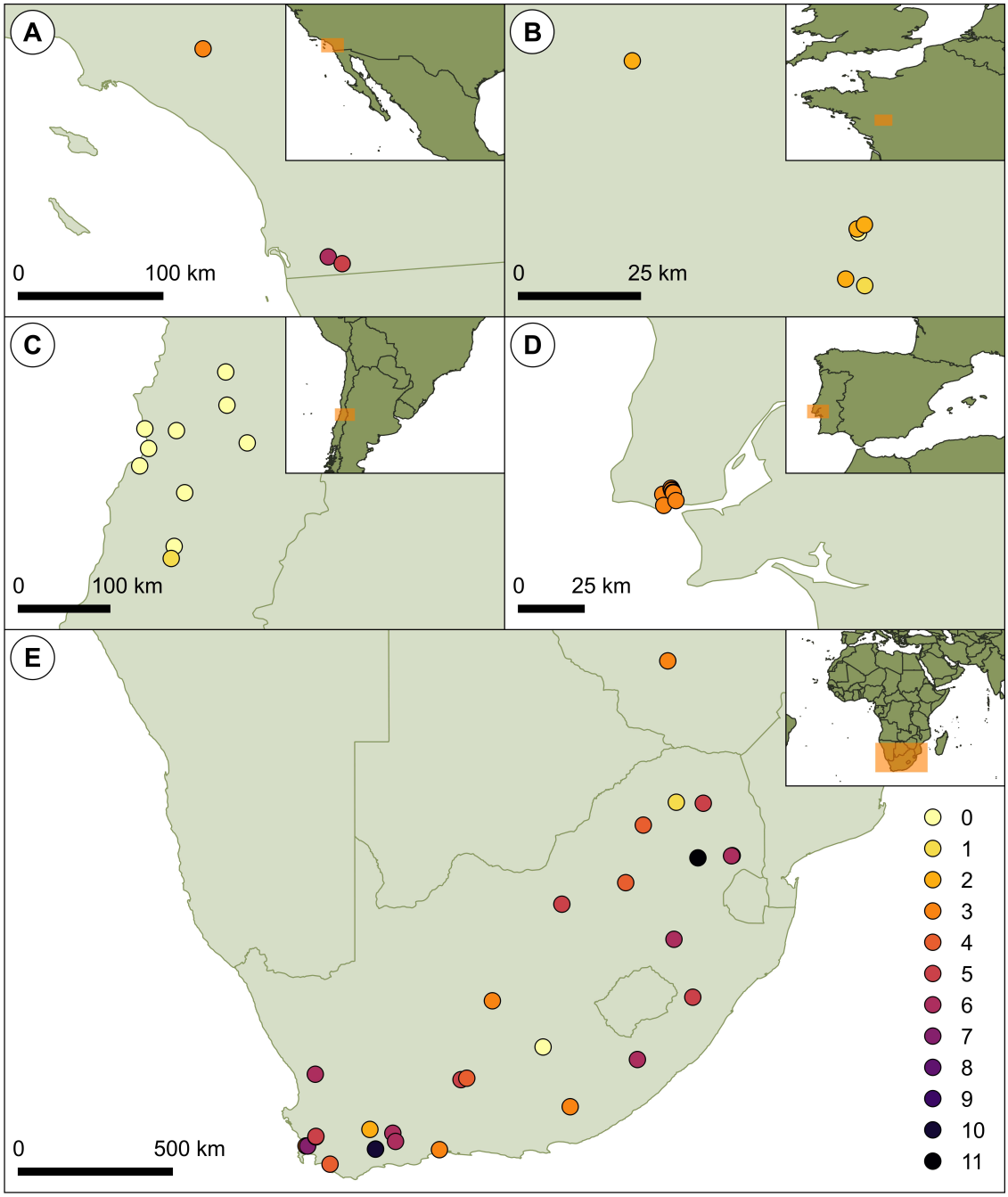
Netso is die parasiete van die gevestigde indringerpopulasies, hoewel nie só breedvoerig bestudeer soos in die natuurlike gebied nie, nietemin op drie kontinente ondersoek. Tot op hede is twee volledige parasitologiese opnames uitgevoer op *X. laevis* in Kalifornië en Chili (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004). 'n Derde ondersoek van die parasiete van *X. laevis* in Portugal is nog nie gepubliseer nie (Rodrigues, 2014).

Min gasheer-parasiet-sisteme leen hulle daartoe om lig te werp op 'n wêreldperspektief oor die lot van gekoëvolueerde parasiete gedurende indringing. Hierdie studie het gemik om dié tekortkoming aan te spreek deur die ERH te toets op geografiese replikate van metasoönparasietgemeenskappe van 'n wêreldwyd verspreide amfibieë. Met hierdie doel voor oë is volledige parasitologiese opnames van *X. laevis* van die natuurlike gebied en die vreemde gebied in westelike Frankryk uitgevoer om die bestaande data van die indringerbevolkings in Chili, Kalifornië en Portugal aan te vul (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014). In besonder is die vrae aangespreek van (1) of *X. laevis* se indringerbevolkings verlies aan metasoönparasiete toon, beide in terme van spesierykheid en infeksievlakke, (2) watter faktore parasiete van *X. laevis* aanspoor om hom te volg na die vreemde gebied, (3) of hierdie begeleidende parasiete dieselfde infeksievlakke kan bereik in die vreemde gebied as in die natuurlike gebied en (4) hoe die gemeenskapsamestellingsongelykhede van die metasoönparasiete met die geografiese oorsprong van die bevolkings van *X. laevis* ooreenstem.

4.2 Metodes

4.2.1 Gasheer- en parasietversameling in Frankryk

In Junie 2017 is 'n totaal van 43 volwasse *X. laevis*, 17 mannetjies en 26 wyfies, deur die uitroeiingsprogram in geaasde fuike vanaf ses liggings regoor die vreemde gebied van *X. laevis* in westelike Frankryk versamel (Figuur 4.1b). Ná vyf weke van eksperimentele teling, waar die lewendige diere apart volgens hulle vindoorde aangehou is, is die bevrore karkasse van die paddas vir parasitologiese analises beskikbaar gemaak. Hoewel laboratoriumomstandighede stres in gashere kan veroorsaak, het die metasoönparasiete van *X. laevis* wat in hierdie opsig al ondersoek is almal oor die vermoë beskik om vir selfs langer tydperke van laboratoriumaanhouding te oorleef (Elkan & Murray, 1952; Jackson & Tinsley, 1988; Thurston, 1970; Tinsley, 1972, 1996; Tinsley & Whitear, 1980; Tinsley & Sweeting, 1974; Tinsley & Wynne Owen, 1979), wat die verdienste van hierdie opname se



Figuur 4.1: Parasietspesierykheid by 47 liggings waar volledige parasitologiese opnames van *Xenopus laevis* uitgevoer is. Dit sluit data van voorheen gepubliseerde werke vanaf die vreemde gebied, naamlik **a** – drie liggings in Kalifornië, Noord-Amerika (Kuperman *et al.*, 2004), **b** – nege liggings in Chili, Suid-Amerika (Castillo *et al.*, 2017) en **d** – agt saamgevoegde liggings in Oeiras, Portugal, Europa (Rodrigues, 2014), in. Nuut gegenereerde data vanaf **e** – 27 liggings regoor die natuurlike gebied in suidelike Afrika en **c** – ses liggings in westelike Frankryk, Europa, is ook ingesluit. Die parasietspesierykheid by 'n ligging word deur sy posisie op die kleurskaal, wat van nul (liggeel) tot elf (swart) strek, aangedui. Alle kaarte word volgens die Mercator-projeksie uitgebeeld.

insluiting in hierdie vergelykende studie beaam. Alle paddas is ongeveer twee weke *post mortem* vir parasiete ondersoek. Voor disseksie is die ontdooide paddas gemeet en die

epidermis, sylyn, oë, bukkaalholte, oor-keel-buisies en neusholtes is vir eksterne parasiete ondersoek. Daarna is die liggaam in die lengte oopgesny en die spysverteringskanaal, nier, uitskeidingsblaas, galblaas met -buisies, lewer, longe, hart en geslagsorgane is verwyder en afsonderlik vir interne parasiete met behulp van 'n stereomikroskoop ondersoek. Helminte is versamel, getel, in warm etanol gefikseer en in 70% etanol gestoor.

4.2.2 Parasiet-uitkenning in die Franse bevolking

Aangesien vriesing skade aan die interne strukture van sagte parasiete kan aanrig, kon tradisionele morfologiese metodes nie gebruik word om die herwonne parasiete uit te ken nie. Die eksemplare is eerder voorlopig uitgeken tot morfospesie gebaseer op die infeksieplek en algemene liggaamstruktuur. Hierdie identiteite is deur molekulêre tegnieke op grond van die DNA-staafkoderingsgeen, *COX1*, bevestig deur twee eksemplare per morfospesie as verteenwoordigers van die hele bevolking te neem. DNA is van twee eksemplare per morfospesie (een van 'n ligging by die middelpunt en een van 'n ligging naby die rand) met die PCRBIO Rapid Extract PCR Kit (PCR Biosystems Bpk., Londen, Verenigde Koninkryk) geëkstraheer. Die geamplifiseerde *COX1*-kopieë is deur die voorwaarste voorvoerder 'L-CO1p' (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') en die truvoorvoerder 'H-Cox1p2' (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') (Littlewood *et al.*, 1997) verkry. Die termosiklusseringsprofiel, soos voorgestel deur Verneau *et al.* (2009), is toegepas. Volgordes is op 'n ABI3500XL volgordebepaler met BigDye® Terminator *weergawe* 3.1 Cycle Sequencing bekom. In die besonder is DNA-produkte se volgordes in beide rigtings met die hulp van die voorvoerderpare bepaal, wat 'n volgorde van ongeveer 450 bp gelewer het. Volgordes is saamgesit, in Geneious-sagteware *weergawe* 9.0 (Biomatters Bpk., Auckand, Nieu-Seeland) geproeflees en met bestaande *COX1*-volgordes op GenBank vergelyk om spesiesidentiteit te bevestig (Héritier *et al.*, 2015; Waeschenbach *et al.*, 2017). Volgordes is ingedien op die GenBank-databasis onder die toetredingsnommers MK342937–40.

4.2.3 Gasheer- en parasietversameling in Suid-Afrika

'n Totaal van 172 volwasse *X. laevis* is van Maart 2017 tot Februarie 2018 in geaasde fuike vanaf 27 liggings regoor die natuurlike gebied in suidelike Afrika versamel. Vindoorde van die bekende verspreiding van al die mitochondriese stamlyne is ingesluit (de Busschere *et al.*, 2016; Furman *et al.*, 2015) (Figuur 4.1e). Alle paddes is binne een maand na versameling, volgens internasionaal aanvaarde standaardwerkprosedures, gedood. Verdowing in 6% etiel-3-aminobensoaat-metaansulfonaat (MS222) (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) is gevolg deur eutanasie wat die knip van die rugstring en vernietiging van die brein behels. Daaropvolgende gasheermetings en parasietsifting en -versameling is onmiddelik *post mortem* uitgevoer met dieselfde metodes as vir die gashere en parasiete

in Frankryk. Alle parasiete is in 70% etanol gepreserveer.

4.2.4 Parasiet-uitkenning in Suid-Afrika

Morfologiese spesie-uitkenning was genoegsaam vir die meerderheid van parasiete wat in Suid-Afrika gevind is, aangesien die parasiete van *X. laevis* welbeskryf is in die natuurlike gebied. Terselfdertyd is die parasiete vanuit die gashere verwyder terwyl hulle steeds lewend was en hulle kon dus optimaal gefikseer word vir morfologiese studies. Om dié rede is molekulêre tegnieke slegs toegepas vir die uitkenning van sommige van die larwe van die Nematoda en metaserkarieë van die Digenea. Ekstraksie en volgordebepaling het presies dieselfde prosedure as vir die parasiete vanuit Frankryk gevolg. Die nematoodlarwe is van mekaar en spesies op GenBank onderskei met die hulp van die *COX1*-geen, waarvan kopieë bekom is met die voorwaarste voorvoerder 'LCO1490' (5'-GGTCAACAAATCA-TAAAGATATTGG-3') en die truvoorvoerder 'HCO2198' (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAA-AAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) en die volgende termosiklusseringsprofiel: aanvanklike denaturasie teen 95℃ vir 2 min, gevolg deur 35 siklusse van denaturasie teen 95℃ vir 30 sek, hibridisering teen 50℃ vir 30 sek en verlenging teen 72℃ vir 2 min, beëindig deur een siklus van verlenging teen 72℃ vir 7 min . Die digeneërmetaserkarieë is deur die volledige tussengetranskribeerde skeiergeenstreek (*ITS*) getipeer, wat deur die voorwaartse en truvoorvoerders 'D1' (5'-AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG-3') en 'D2' (5'-CGTTACTGAGGGAATCCTGGT-3') geamplifiseer is (Galazzo *et al.*, 2002) met die volgende termosiklusseringsprofiel: aanvanklike denaturasie teen 95℃ vir 3 min, gevolg deur 35 siklusse van denaturasie teen 95℃ for 1 min, hibridisering teen 56℃ vir 1 min en verlenging teen 72℃ for 2 min, beëindig deur een siklus van verlenging teen 72℃ vir 5 min.

4.2.5 Parasitologiese opnames van die literatuur en verduideliking van parasitologiese parameters

Drie volledige parasitologiese opnames van indringer-*X. laevis*, uitgevoer in Kalifornië (Kuperman *et al.*, 2004), Chili (Castillo *et al.*, 2017) en Portugal (Rodrigues, 2014), is vir vergelyking ingesluit (Figuur 4.1a,c,d). Vergelykende ligging-spesifieke data is nie vir die natuurlike gebied beskikbaar nie, daarom is slegs die resultate van ons parasitologiese opname ingesluit, tesame met ons resultate van Frankryk. Resultate van vindoorde binne dieselfde akwatiese sisteme, soos damme op dieselfde eiendom wat deur 'n rivier verbind word, is saamgevoeg. In totaal is 47 liggings in die vergelyking ingesluit (verwys na Bylaag A vir breedvoerige inligting oor alle vindoorde). Slegs metasoönparasiete, waaronder myte, bloedsuiers en helminte, is in die analise ingesluit, te wyte aan die feit dat die vriesing van gashere, soos in Frankryk, dit onmoontlik maak om protosoönparasiete te herwin.

Parasietspesierykheid (aantal spesies in alle gashere van een ligging) en die per-ligging-voorkomsyfer van elke parasietspesie (persentasie gashere van een ligging wat met 'n spesifieke parasiet besmet is) is vir elke ligging afsonderlik bereken, *sensu* (Bush *et al.*, 1997). Ander parasitologiese parameters, naamlik gemiddelde intensiteit en gemiddelde veelheid (Bush *et al.*, 1997) kon nie vanaf die beskikbare inligting van al die bronpublikasies afgelei word nie en is slegs vir die nuut gegenereerde data vanaf Frankryk bereken. Vir verdere analises is gesommeerde parasietvoorkomsyfer (die som van die voorkomsyfers van elke parasietspesie by 'n ligging) en gemiddelde parasietvoorkomsyfer (gemiddeld van die voorkomsyfers van alle parasietspesies wat by 'n ligging te vinde is), volgens Torchin *et al.* (2003), ook bereken. Gesommeerde voorkomsyfer gee 'n aanduiding van die moontlike impak van die parasitisme op die gasheerbevolking, aangesien dit 'n maatstaf van die ongeweegde kumulatiewe omvang van die parasitisme wat 'n gasheer by 'n ligging ondervind, is (Torchin *et al.*, 2003). Laastens, vir elk van die parasietspesies wat op 'n Afrika-gasheer teenwoordig is, is die voorkomsfrekwensie oor Suid-Afrika (persentasie van liggings waar 'n parasiet te vinde is) en die gemiddelde spesievoorkomsyfer (gemiddeld van die per-ligging-voorkomsyfer oor alle liggings in Suid-Afrika, buiten dié met 'n voorkomsyfer van nul) bereken.

4.2.6 Statistiese analises

Gasheermonstergrootte kan telkemale 'n sterk invloed op die aantal parasietespesies wat by 'n ligging versamel word, hê (Engemann *et al.*, 2015; Luque & Poulin, 2007). Om vas te stel of die ongebalanseerde monsternemingspogings by die 47 liggings, wat strek van een individu in Zimbabwe tot 132 in Dulzura-spruit, Kalifornië, ons resultate kon verstrengel deur te korreleer met die herwonne spesierykheid by hierdie liggings, is die Spearman se rangkorrelasiekoëffisiënt bereken.

Om te ontleed of gashere van die vreemde en natuurlike gebiede soortgelyke vlakke van parasitisme ervaar, is die 27 natuurlike liggings met die 20 vreemde liggings in terme van parasietspesierykheid en gesommeerde en gemiddelde voorkomsyfers met die hulp van die Wilcoxon-Mann-Whitney-toets vergelyk.

Die effek van verskeie faktore op parasiete se waarskynlikheid om *X. laevis* uit Afrika uit te volg is afsonderlik geëvalueer. Slegs die parasiete vanaf die natuurlike gebied wat tot op die punt uitgeken is waar genoegsame lewensgeskiedenisinligting verkry kon wors, is in die analise ingesluit. Die effek van die parasiete se taksonomiese klas (Acari, Cestoda, Digenea, Hirudinea, Monogenea of Nematoda), tipe lewensiklus (direk of indirek), lewenstadium wanneer teenwoordig in die *X. laevis*-gasheer (alle stadia, volwassene, sist of larf) en teenwoordigheid in die Wes-Kaap-provinsie, waarvandaan die meeste indringer-*X. laevis* hulle oorsprong het (de Busschere *et al.*, 2016), is deur Fisher se presiese toets van onafhanklikheid geassesseer. Die Wilcoxon-Mann-Whitney-toets is

aangewend om die effek van gasheer-spesifisiteit (hoog na laag: dit is, gemeld van ’n enkele gasheerspesie, ’n enkele gasheergenus of menige gasheergenera), gemiddelde spesievoorkomsyfer oor alle liggings, uisluitend liggings met ’n voorkomsyfer van nul, en voorkomsfrekwensie in Suid-Afrika op die aanwesigheid of afwesigheid van ’n parasiet in die indringerbevolkings.

Ons het spesifiek twee parasiete wat die mees algemeen in beide die natuurlike en vreemde gebied was, gekies om te ondersoek of parasiete soortgelyke infeksievlakke in beide die inheemse en uitheemse bevolkings kan behaal. Student se *t*-toets is verkies om die effek van geografiese oorsprong op per-ligging-voorkomsyfer te bepaal, synde die responsveranderlikes normaal verdeel met gelyke variansie vir elke groep was.

Om die samestelling van die parasietgemeenskappe in die twee gebiede te ondersoek is twee metodes gebruik – eerstens om vir ’n beduidende verskil in gemeenskapsamestelling, gebaseer op geografies oorsprong van die gasheer, te toets en dan om die ongelyksoortighede visueel te vertolk. Voor die analise is die per-ligging-voorkomsdata deur die Hellinger-metode getransformeer (Legendre & Gallagher, 2001), deur gebruik te maak van die *vegan*-pakket in R (Oksanen *et al.*, 2019). Na aanleiding van die feit dat sekere liggings nie parasietspesies gedeel het nie, is ’n skynparasietspesie tot elke ligging teen ’n per-ligging-voorkomsyfer van 50% gevoeg. Hierdie is gedoen om ’n situasie van onbepaalde ongelyksoortigheidsindekse tussen liggings te vermy (sien ook Locke *et al.* (2012) en Warburton *et al.* (2016)). Hierdie tegniek is veral van toepassing in gevalle waar versamelings vir biologiese redes verarm is, soos die geval is met indringerdiere en hulle parasietgemeenskappe (Clarke *et al.*, 2006). Bray-Curtis-afstande, wat nie alleen gevoelig is vir die aanwesigheid of afwesigheid van spesies by liggings nie, maar ook vir verskille in die voorkomsyfers van bepaalde spesies tussen liggings, is aangewend om die samestellingsongelyksoortigheid van parasietgemeenskappe tussen liggings te meet (Ricotta & Podani, 2017). Bray-Curtis is ’n halfmetriese ongelyksoortigheidsindeks, wat dit van toepassing maak op verarmde gemeenskappe waar spesievoorkomsyfers nie normaal verdeel is nie. ’n Analise van gelyksoortigheid (ANOSIM), gebaseer op die Bray-Curtis-afstande is in die R-pakket *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019) met 999 permutasies uitgevoer om te toets of daar inderdaad beduidende verskille in gemeenskapsamestelling tussen die natuurlike en vreemde gebied te vinde is. Niemetriese multidimensionele skalering (NMDS) is ook met die hulp van die *vegan* R-pakket aangewend om uit te beeld of die parasietggemeenskappe van elk van die liggings in duidelik uitkenbare geografiese groepe val op basis van samestellingsongelykheid (Oksanen *et al.*, 2019). Die omslagfunksie `metaMDS()` is met 20 stogastiese inisiasies benut om in ’n aanvanklike stap die Bray-Curtis-afstande en daaarna die oplossing van die ordinasie te bereken ten einde die ongelyksoortigheid van die parasietgemeenskappe uit te beeld. Ellipse is volgens die standaardafwyking vanaf die sentroïed (geweegde gemiddelde) vir elke groep bereken. Die parasietspesierykheid is op die twee-komponent ordinasiespasie uitgelê met ’n voorafveronderstelde nielineêre verhouding via die passing van ’n veralgemeende additiewe

model wat met behulp van die `ordisurf()`-funksie bereken is (Oksanen *et al.*, 2019). Die veralgemeende additiewe model het beraam of daar 'n beduidende verskil tussen die waargenome trosvorming en die variasie in spesierykheid tussen die liggings mag wees (Marra & Wood, 2011).

Alle statistiese analises is in die ingeboude pakket *stats* in die program R *weergawe* 3.4.4 (R Core Team, 2018) uitgevoer, tensy anders genoem. Opsommingstatistieke is in die R-pakket *Rmisc* (Hope, 2013), of in *dplyr* (Wickham *et al.*, 2017) bereken. Resultate is met behulp van die *ggplot2*-pakket uitgebeeld (Wickham, 2016).

4.3 Resultate

4.3.1 Parasitologiiese opnames in Frankryk en Suid-Afrika

Die *X. laevis* vanaf Frankryk het in snoet-urostiel-lengte van 25.2 tot 99.3 mm (gemiddeld = 69.3 mm, SD $\pm$ 14.08) gewissel. Twee parasietspesies is op morfologiese en genetiese wyse uitgeken vanuit die 43 gashere van Frankryk. Die parasiet vanuit die blaas was die monogeneër *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1956, van die Polystomatidae en insgeslyk was die lintwurm wat in die intestinum voorgekom het se identiteit bevestig as *Cephalochlamys namaquensis* (Cohn, 1906), van die Cephalochlamydidae. Beide spesies het wydverspreid oor die gebied voorgekom, aanwesig by beide noordelike en suidelike randliggings, asook liggings by die middelpunt naby die invoerligging. 'n Gemiddelde voorkomsyfer van 19% en gemiddelde intensiteit van twee wurms per gasheer is vir *P. xenopodis* by vier liggings gevind. In die geval van *C. namaquensis* is 'n gemiddelde spesievoorkomsyfer van 63% en 'n gemiddelde intensiteit van vier wurms oor vyf lokaliteite aangeteken (Tabel 4.1).

Die paddas wat in Suid-Afrika versamel is, was soortgelyk in grootte as daardie van Frankryk, met snoet-urostiel-lengtes wat van 38.3 tot 110.2 mm (gemiddeld = 71.5, SD $\pm$ 15.66) gestrek het. Vanuit 'n total van 172 paddas wat by 27 liggings in die natuurlike gebied in suidelike Afrika versamel is, is 21 verskillende metasoönparasietspesies herwin. Daaronder was verteenwoordigers van ses verskillende taksonomiese groepe, naamlik die Acari, Hirudinea, Digenea, Monogenea, Cestoda en Nematoda. Parasietspesierykheid het heelwat variasie getoon, van nul parasietspesies in die paddas vanaf 'n swembad naby Colesberg, Noord-Kaap, tot elf parasietspesies in die paddas van damme in 'n ongerepte bergstroom naby Dullstroom, Mpumalanga (Figuur 4.1e). Die sewe liggings waar daar minder as vier parasietspesies by elk herwin is, was almal in onlangs vesteurde of nuut gevestigde habitatte geleë. Hierdie habitatte sluit swembaddens, ornamentele tuindammetjies, rekreasionele damme in residensiële gebiede, afloop van slagpale en gewasbesproeiingsisteme, tydelike bergstrome, damme wat stroomaf van

Tabel 4.1: Verspreiding en infeksievlakke van die twee parasiete van *Xenopus laevis* vanaf die vreemde gebied in westelike Frankryk, naamlik *Protopolystoma xenopodis* (**p**) en *Cephalochlamys namaquensis* (**c**). Die bevolking word deur 43 paddas van ses vindoorde voorgestel. Liggings 1 tot 3 lê naby aan die rand van die indringergebied (buiterand) en liggings 4 tot 6 lê naby aan die oorspronklike invoerligging (middelpunt). Gemiddelde infeksie-intensiteit word weergegee, saam met mediaan intensiteit tussen blokhakies en minimum- en maksimumwaardes tussen ronde hakies. Gemiddelde waardes word bereken met die insluiting van liggings met 'n voorkomsyfer van nul. Afwesige infeksievlakwaardes, as gevolg van die afwesigheid van 'n parasietspesie by 'n betrokke versameloord, word deur 'n 'n.v.t.' aangedui.

Vindoord	Aantal gashere	Voorkomsyfer		Gemiddelde veelheid		Intensiteit	
		p	**c**	**p**	**c**	**p**	**c**
Ligging 1	8	38%	88%	0.9	3.3	2 [3] (1–3)	4 [1] (1–11)
Ligging 2	10	n.v.t.	70%	n.v.t.	1.0	n.v.t.	1 [1] (1–2)
Ligging 3	10	20%	40%	0.2	2.0	1	5 [4] (2–10)
Buiterand	28	18%	64%	0.3	2.0	2 [1] (1–3)	3 [2] (1–11)
Ligging 4	5	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
Ligging 5	4	25%	100%	0.8	1.5	3	2 [2] (1–2)
Ligging 6	6	33%	83%	0.3	5.7	1	7 [3] (1–18)
Middelpunt	15	20%	60%	0.3	2.7	2 [1] (1–3)	4 [2] (1–18)
Alle liggings	**43**	**19%**	**63%**	**0.3**	**2.2**	**2 [1] (1–3)**	**4 [2] (1–18)**

informele nedersettings lê of kunsmatige damme in botaniese tuine in. Daarteenoor was die nege gasheerbevolkings met 'n parasietspesierykheid van ses of meer afkomstig van natuurlike of standhoudende mensgemaakte waterliggame in natuurlike omgewings, soos plaasdamme en hulle verbindingsriviere, of damme en poele in bergstrome. Toegegee, sommige van hierdie bevolkings was vanuit tuindammetjies versamel, maar dié was dan in die nabye omgewing van groot natuurlike waterliggame in onversteurde gebiede. Die twee mees algemene parasiete was by verre *P. xenopodis* en *C. namaquensis* wat beide by 25 van die 27 liggings (92.6%) teenwoordig was. Die res van die parasietspesies was almal veel skaarser in Suid-Afrika – slegs aanwesig by 'n maksimum van 10 lokaliteite (37.0%). Die gemiddelde spesievoorkomsyfer van *P. xenopodis* oor alle liggings heen, insluitend dié waar die parasiet nie voorgekom het nie, was hoër as in Frankryk teen 56%. In die geval van *C. namaquensis* was dieselfde waarde 65%.

In die Chileense indringerbevolking van *X. laevis* is slegs een parasietspesie, uitgeken as 'n larwale nematode van die genus *Contracaecum*, opgeteken teen 'n gemiddelde spesievoorkomsyfer van 3.4% uit 179 gashere van 10 liggings (Figuur 4.1c) (Castillo *et al.*, 2017). Die Kaliforniese parasietgemeenskappe, wat versamel is vanaf 230 gashere van 3 liggings, was heelwat meer divers en het parasiete wat beide van suidelike Afrika en Kalifornië afkomstig was, ingesluit (Kuperman *et al.*, 2004). Parasietspesiesrykheid het gewissel van drie tot ses by die drie liggings, met 'n totaal van sewe parasietspesies regoor die streek (Figuur 4.1b) (Kuperman *et al.*, 2004). Al drie die parasietgemeenskappe het drie Suid-Afrikaanse parasiete bevat, naamlik die twee monogeneërs, *Gyrdicotylus gallieni* Vercammen-Grandjean, 1960 (gemiddelde spesievoorkomsyfer van 12%) en *P. xenopodis*

(gemiddelde spesievoorkomsyfer van 47%), en die lintwurm, *C. namaquensis* (gemiddelde spesievoorkomsyfer van 47%) (Kuperman *et al.*, 2004). Die Portugese indringerbevolking van *X. laevis*, verteenwoordig deur 80 gashere vanuit twee strome in Oeiras, het die Suid-Afrikaanse *P. xenopodis* teen 'n gemiddelde spesieprevalensie van 55% en twee ander parasiete wat inheems was tot die indringergebied gehuisves (Figuur 4.1d) (Rodrigues, 2014).

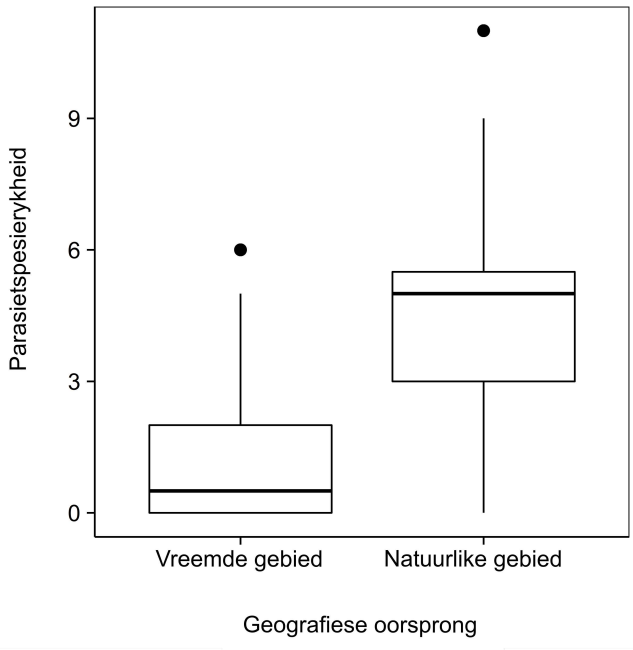
4.3.2 Effek van monsternemingspoging

Ten spyte van groot variasie in die monsternemingspogings tussen die liggings, het parasietspesierykheid nie beduidend met monstergrootte gekorreleer nie (Spearman se rangkorrelasie, $\rho_s = 0.15$, n = 47, $p = 0.31$). Dit beteken nie dat al die spesies by elke ligging gevind is nie, maar hierdie resultaat skakel variasie in monstergrootte as 'n moontlike strengelfaktor uit. Derhalwe het ons nie gebruik gemaak van spesierykheidsberamers om moontlike onakkuraathede in verdere analises te korrigeer nie (Engemann *et al.*, 2015).

4.3.3 Parasitisme van gashere in die natuurlike en vreemde gebiede

Van die 21 metasoönparasietspesies wat vanaf die gashere in die natuurlike gebied aangeteken is, het slegs drie parasietspesies dit reggekry om *X. laevis* te vergesel gedurende die proses van indringing. Daarby het 'n totaal van sewe parasietspesies wat inheems is tot die indringergebiede, die uitheemse *X. laevis* gekoloniseer met aankoms. Parasietspesierykheid was beduidend hoër in gashere vanaf die natuurlike gebied (gemiddeld = 4.7 spesies per bevolking, SD $\pm$ 2.35) in vergelyking met dié vanaf die vreemde gebied (gemiddeld = 1.4 spesies per bevolking, SD $\pm$ 1.79) (Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, $p < 0.001$) (Figuur 4.2). Dit was ook die geval vir die gesommeerde voorkomsyfer (Wilcoxon-Mann-Whitney--toets, $p < 0.001$), waar gashere vanaf die natuurlike gebied (gemiddeld = 254%, SD $\pm$ 130.5) groter kumulatiewe effekte van parasitisme as in die vreemde gebied (gemiddeld = 49%, SD $\pm$ 60.5) ervaar het. Eweseer was gemiddelde parasietvoorkomsyfers beduidend hoër in die natuurlike gebied (gemiddeld = 56%, SD $\pm$ 24.1) as in die vreemde gebied (gemiddeld = 20%, SD $\pm$ 25.7) (Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, $p < 0.001$).

In teenstelling met die oorhoofse tendens van parasietverlies van die natuurlike na die vreemde gebiede was daar heelwat variasie in parasietspesierykheid in die natuurlike gebied (van nul parasiete na 11) en tussen die verskeie vreemde gebiede (van nul parasiete na ses) (Figuur 4.1a–e). Dit is opvallend dat parasietspesies in die natuurlike gebied nie na gelang van klimaatstreke of biome wissel nie, met liggings met hoë spesierykheid heeltemal vermeng met liggings met laer spesierykheid oor die gebied (Figuur 4.1e).



Figuur 4.2: Metasoönparasietspesierykheid van bevolkings van *Xenopus laevis* is laer in die vreemde gebied as in die natuurlike gebied. Minimum-, eerstekwartiel-, mediaan-, derdekwartiel- en maksimumspesierykheidswaardes vir 20 liggings in die indringergebied in Europa en Noord- en Suid-Amerika en 27 liggings in die natuurlike gebied in Afrika word aangetoon. Ultskieters word met swart kolletjies aangedui.

4.3.4 Eienskappe van begeleidende parasiete

Ult die 13 Suid-Afrikaanse parasiete wat genoegsaam uitgeken is vir die onderskeiding van eienskappe, het slegs drie as indringers saam met hulle gasheer opgetree, naamlik *P. xenopodis*, *C. namaquensis* en *G. gallieni*. Taksonomiese klas was ’n beduidende aanwyser of ’n parasiet wel die gasheer sou vergesel tydens indringing (Fisher se presiese toets, $p = 0.005$), omdat al die monogeneër- en lintwurmparasiete in ten minste een van die indringerbevolkings aanwesig was, maar geen van die myte, bloedsuiers, digeneërs of nematode nie. Insgelyks was parasiete met direkte lewensiklusse beduidend oorverteenwoordig in die begeleidende spesiepoel (Fisher se presiese toets, $p = 0.04$). Aan die ander kant was gasheerspesifisiteit nie ’n beduidende voorspeller van koïndringing nie (Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, $p = 0.10$). Nietemin is dit merkwaardig dat die koïndringerparasiete met hoër gasheerspesifisiteit ’n direkte lewensiklus toon, terwyl dié met lae gasheerspesifisiteit ’n indirekte lewensiklus toon. Die lewenstadium van die parasiet wanneer dit die volwasse *X. laevis* parasiteer het geen effek gehad op sy aanwesigheid in die vreemde gebied nie (Fisher se presiese toets, $p = 0.07$). Netso was die niebegeleidende parasiete nie beduidend meer afwesig in die Kaapse gasheerbevolkings nie (Fisher se presiese toets, $p = 0.16$). Tog was teenwoordigheid in die Kaapse gasheerbevolkings ’n voorvereiste vir koïndringing. Die parasiete wat nie hulle gasheer begelei het nie was geneig om dié te wees wat in minder gasheerbevolkings regoor die natuurlike gebied

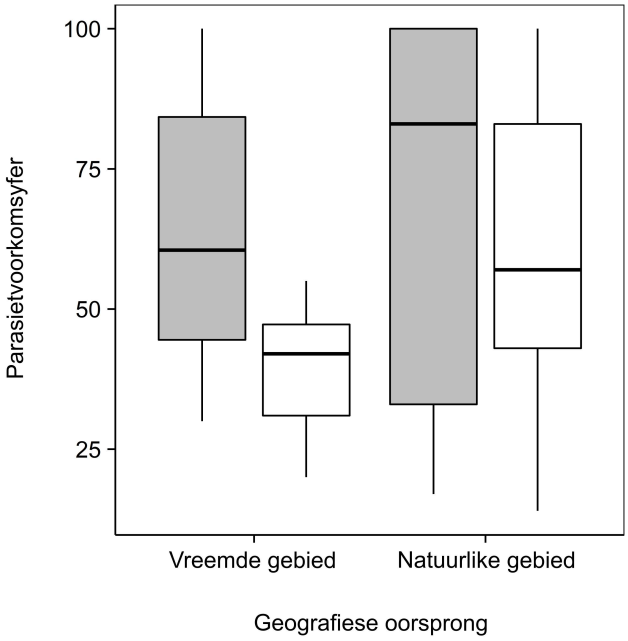
voorgekom het (mediaan = 17%), in vergelyking met dié wat die gasheer wél begelei het (mediaan = 93%) (Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, $p = 0.03$). Daarteenoor was gemiddelde spesievoorkomsyfers nie beduidend verskillend tussen begeleidende (mediaan = 60%) en niebegeleidende parasiete nie (mediaan = 54%) (Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, $p = 0.57$).

4.3.5 Vatbaarheid van indringergashere vir parasitisme

Die twee mees prevalente parasietspesies in beide die natuurlike en vreemde gebiede was *P. xenopodis* en *C. namaquensis*. Die per-ligging-voorkomsyfer van hierdie spesies by die liggings waar hulle teenwoordig was, is tussen die natuurlike en vreemde gebiede vergelyk om te bepaal of parasiete soortgelyk infeksievlakke oor die verspreiding van *X. laevis* heen kan behaal (Figuur 4.3). In die geval van *C. namaquensis* was daar geen beduidende verskil tussen die persentasie gashere wat geïnfekteer is in die natuurlike (gemiddeld = 65%, SD $\pm$ 35.1) in vergelyking met die vreemde gebied (gemiddeld = 25%, SD $\pm$ 35.4) nie (Student se *t*-toets, $t = -0.583$, $p = 0.57$). Die omgekeerde was waar vir *P. xenopodis*, gegewe die feit dat per-ligging-voorkomsyfers beduidend hoër in die natuurlike (gemiddeld = 56%, SD $\pm$ 31.3) versus die vreemde gebied (gemiddeld = 16%, SD $\pm$ 21.0) was (Student se *t*-toets, $t = -2.984$, $p = 0.006$).

4.3.6 Ongelyksoortigheidsanalises van die parasietgemeenskappe

Die globale ANOSIM het aangedui dat die algehele parasietgemeenskapsamestelling tussen liggings beduidend verskil het, indien die geografiese oorsprong, hetsy inheems of uitheems, van die gashere in ag geneem was (ANOSIM, $R = 0.41$, $p = 0.001$). Kwalitatiewe uitbeelding van parasietgemeenskapsongelyksoortighede tussen die natuurlike en vreemde gebiede deur NMDS het 'n stabiele oplossing voortgebring (stres = 0.13) en het ooreengestem met die resultate van die ANOSIM omdat die liggings wel gebaseer op die geografiese oorsprong van die gashere saamgetros het (Figuur 4.4). Hierdie tendens word duidelik voorgestel deur die nie-oorvleuelende ellipse wat al die liggings omring wat binne een standaardafwyking van die sentroïed van elkeen van die geografiese groepe lê. Die persentasie variansie in spesierykheid wat deur die statisties beduidende respons-oppervlak, soos dit gepas is deur die algemene additiewe model, verklaar is, was 94% ($F_{8.03,9} = 72.29$, $p < 0.001$). Dit bevestig dat die hoogste spesierykheidswaardes geneig is om met die natuurlike gebied geassosieer te wees en laer spesierykheidswaardes met die vreemde gebied. Twee aanmerklike uitskieters in die natuurlik gebied is Colesberg en Polokwane, waar die gashere onderskeidelik nul of een parasietspesies gehuisves het. Hierdie liggings het nie saam met die res van die inheemse liggings getros nie. Hierdie verwantskap het ook aangedui dat natuurlike liggings met minder parasiete geneig is

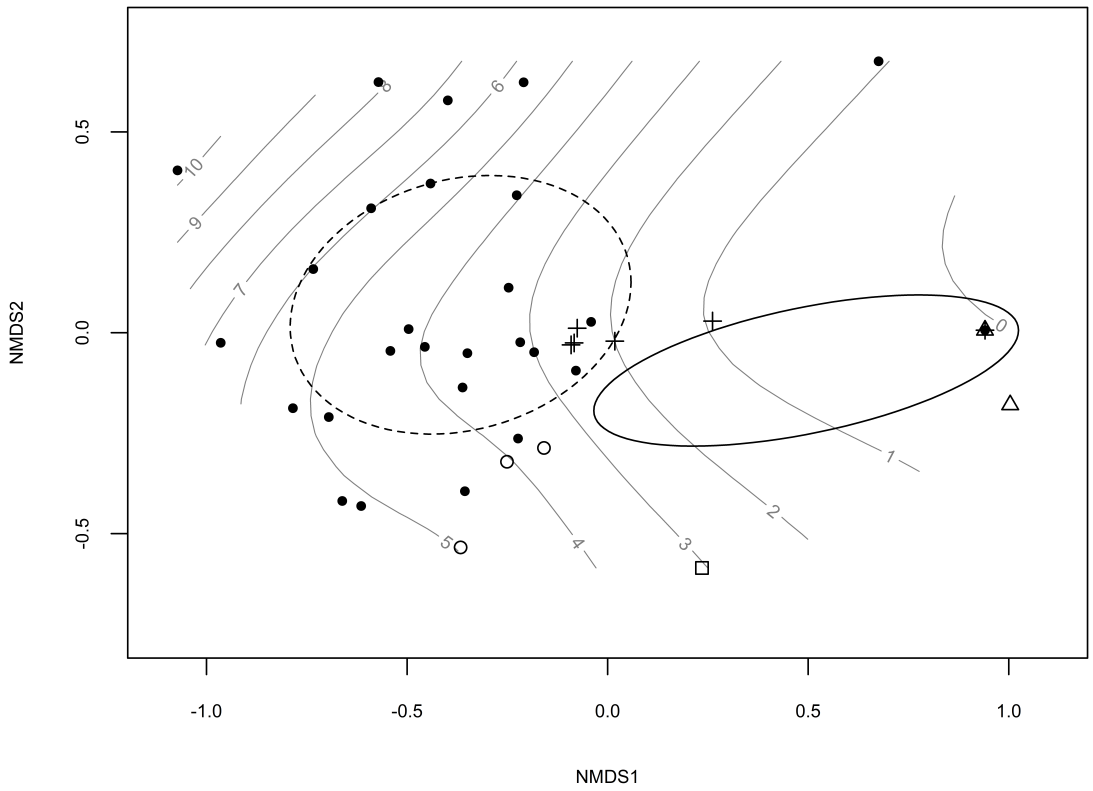


Figuur 4.3: Per-ligging-voorkomsyfer van 'n monogeneërparasiet van *Xenopus laevis* is hoër in die natuurlike gebied as die vreemde gebied, maar is nie beduidend verskillend in die geval van 'n sestoodparasiet nie. Die minimum-, eerstekwartiel-, mediaan-, derdekwartiel- en maksimumvoorkomsyfers van die sestode, *Cephalochlamys namaquensis*, oor agt liggings in die vreemde gebied en 25 liggings in die natuurlike gebied, word in grys aangedui. Dieselfde waardes vir die monogeneër, *Protopolystoma xenopodis*, ook oor agt liggings in die vreemde gebied en 25 liggings in die natuurlike gebied, word in wit aangedui.

om nader aan die liggings van die vreemde gebied te lê. In die besonder was verarmde parasietgemeenskappe in die natuurlike gebied byne identies in gemeenskapsamestelling aan die vier Franse lokaliteite wat beide *P. xenopodis* and *C. namaquensis* bevat het. Vreemde liggings met nuut verkrygde parasiete, soos dié in Chili, Kalifornië en Portugal, was egter geneig om minder soortgelyk aan die natuurlike liggings te wees.

4.4 Bespreking

Hierdie studie wys vir die eerste keer dat 'n wêreldwye indringeramfibie verlies aan metasoönparasiete ondervind tydens indringing. Oor die verskeie vreemde gebiede heen het slegs drie parasiete *X. laevis* op sy indringertog vergesel en het sewe parasite dit met aankoms gekoloniseer, in skrille kontras met die 21 parasiete wat herwin is vanuit *X. laevis* in die natuurlike gebied. Daarby stel 'n afname in die kumulatiewe effekte van parasitisme en infeksievlakke van sekere parasiete in die vreemde gebied voor dat daar ook moontlike vrystelling is van sommige van die nadelige effekte van parasitisme. Overgesetsynde verleen hierdie bevindinge steun aan die ERH in terme van verlies aan metasoönparasiete. Parasietverlies van die natuurlike na die vreemde gebied is 'n gegewe



Figuur 4.4: Niemetriese multidimensionele skalering van samestellingsongelyksoortigheid onthul dat die metasoönparasietgemeenskappe van natuurlike (suidelike Afrika) en indringerbevolkings (Kalifornië, Chili, Frankryk en Portugal) van *Xenopus laevis* aparte trosse vorm as gevolg van verlies aan vyande in indringergashere. Ingesluit is 27 liggings van suidelike Afrika (gevulde sirkels), drie liggings van Kalifornië (ongevulde sirkels), nege liggings van Chili (ongevulde driehoeke), ses liggings van Frankryk (kruisies) en een ligging van Portugal (ongevulde vierkant). Twee natuurlike liggings vermeng heeltemal met die indringerliggings, naamlik Polokwane, in die boonste regterhoek, en Colesberg, wat in die Chileense tros lê. Die gepasde gladde responsoppervlak (grys kontoerlyne) stem met spesierykheid by elke ligging ooreen. Die ovale omring al die liggings wat binne een standaardafwyking van die sentroïed van die vreemde gebied (soliede lyn) en natuurlike gebied (onderbroke lyn) val.

in meeste organismes (Heger & Jeschke, 2014; Lui & Stiling, 2006; Torchin *et al.*, 2003) en tipies kan kolonisering deur nuwe parasiete wat inheems is aan die vreemde gebied nie hierdie verlies teenwerk nie (Torchin *et al.*, 2003). Hierdie is in die besonder ook vir die enigste twee amfibieë wat tot op hede op ‘n soortgelyke wyse geasesseer is, naamlik die gewone coquí, *E. coqui* (Marr *et al.*, 2008), en die Kubaanse loofpadda, *O. septentrionalis* (Ortega *et al.*, 2015), gevind.

In kontras met die twee amfibiespesies wat tot op hede ondersoek is, is die patroon van metasoönparasietverlies in *X. laevis* ongeag die aard van die verskillende gebiedsuitbreidingsroetes, kontinente en klimaatstreke waargeneem. In die meerderheid van die indringerbevolkings van *X. laevis* is onderskeie gebiede toegetree na ’n groot aantal generasies in laboratoriumaanhouding (Crayon, 2005; Lobos *et al.*, 2013; Measey *et al.*, 2012; van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Hierdie indringergeskiedenis

word deur die feit dat die twee mees algemeen begeleidende parasiete, *P. xenopodis* en *C. namaquensis*, beide vir minstens ’n jaar in laboratoriumaangehoude gashere kan oorleef, weerspieël (Jackson & Tinsley, 1988; Tinsley, 1996). In sy natuurlike gebied is *X. laevis* daarvoor berug dat dit gewoonlik een van die eerste akwatiese vertebrate is wat nuwe habitatte binnetree. Dié word dikwels via oorlandse migrasie of via sprongverspreiding met die hulp van plaasdamme en mensgemaakte waterweë langs die roete bereik (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2016; Measey & Channing, 2003; Measey *et al.*, 2017). Die resultate van die huidige studie dui aan dat hierdie pionierbevolkings kenmerkende parasietgemeenskappe huisves wat uitgeken word aan hulle laer parasietspesierykheid in vergelyking met dié van indringerbevolkings elders, veral in Frankryk. Daarby vind parasietverlies in al die klimaatstreke waar *X. laevis* te vinde is, of dit nou gematig, Mediterreens of sub-tropies is, plaas.

Desnieteenstaande die gedeelde verlies aan parasiete oor kontinente en uitbreidingsmodaliteite heen, kan die meganismes wat die verlies aanwakker waarskynlik nie aan ’n enkele faktor toegeskryf word nie. In die meerderheid van gevalle is dit waarskynlik ‘n noodwendige gevolg van lang tydperke van laboratoriumaanhouding. Na vrystelling in die natuur mag parasietverlies as gevolg van habitatsongeskiktheid vir lewensiklusse teweeggebring word, veral in terme van verlies aan tussengashere of ongunstige omgewingstoestande. Byvorbeeld maak *P. xenopodis* op spesifieke temperatuuroptima vir eierproduksie staat (Jackson & Tinsley, 1988) en *C. namaquensis* op die beskikbaarheid van ’n geskikte eenoogkrefie as tussengasheer (Ferguson & Appleton, 1988a; Thurston, 1967). Daarteenoor mag dit die gevolg wees van groter belegging in immunologiese verwering deur die gasheer tydens gebiedsuitbreiding, veral in die natuurlike gebied. Verspreidende *X. laevis* verskil in sekere opsigte van *X. laevis* van gevestigde habitatte. In Frankryk toon bevolkings van *X. laevis* van die rand van die gebied laer belegging in voortplanting teenoor verhoogde stamina wat kan bydra tot verspreidingsvermoë (Courant *et al.*, 2017; Louppe *et al.*, 2017). Die immunologiese verweer teen parasiete in *X. laevis* het tot op hede min aandag geniet en mag dalk nie sukses *per se* beïnvloed nie, veral in die lig van die lae patogenisiteit van sy parasiete (Tinsley, 1996), maar dit kan nie as ’n moontlike bydraende faktor uitgeskakel word nie.

Aan die hand van hierdie inligting is dit opvallend dat die drie begeleidende parasiete, naamlik die monogeneërs *P. xenopodis* en *G. gallieni* en die lintwurm *C. namaquensis*, sekere eienskappe openbaar wat hulle koïndringing sou kon voorthelp. Nie net is al drie hierdie parasiete in die Kaap, waarvandaan die meeste van die *X. laevis* uitgevoer is, teenwoordig nie (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007), hulle is ook in beduidend meer van die bestudeerde inheemse bevolkings teenwoordig as die parasiete wat nie die gasheer begelei het nie. Die waarskynlikheid vir ’n parasiet om *X. laevis* te begelei was nie beduidend beïnvloed deur hulle gemiddelde spesievoorkomsyfer in die natuurlike gebied nie, ’n moontlike gevolg van die omvang van die langdurige uitvoer van *X. laevis* (van Sittert & Measey, 2016). Aangesien indringers in die reël nie sulke hoë vlakke van

propaguuldruk ervaar nie, maak dit sin dat die begeleidende parasiete van *X. laevis* nie hoë voorkomssyfers in die natuurlike gebied benodig om koïndringing te fasiliteer nie, in teenstelling met die tendens in baie ander koïndringerparasiete (Torchin *et al.*, 2003). Eweneens beskik die meerderheid van die begeleidende parasiete van *X. laevis* oor direkte lewensiklusse, 'n eienskap wat lank reeds met 'n hoër waarskynlikheid van koïndringing gekoppel word (Kuperman *et al.*, 2004; Torchin & Mitchell, 2004). Nogtans toon die resultate dat parasiete met komplekse lewensiklusse ook betrokke kan wees by koïndringing, ooreenkomstig met die bevindinge van 'n onlangse oorsig van die literatuur (Lymbery *et al.*, 2014). Die vlak van gasheerspesifisiteit van die begeleidende parasiete verklap 'n soortgelyke tweeledigheid. Ondanks die bevindinge van die meerderheid van studies wat deur Heger & Jeschke (2014) hersien is, demonstreer hierdie studie dat die noue band tussen die gasheer en die begeleidende gasheerspesifieke monogeneërparasiete, soos die hoogs gasheerspesifieke *P. xenopodis* en *G. gallieni*, koïndringing bevorder, eerder as onderdruk. Aan die ander kant van die spektrum lê die ander begeleidende parasiet, *C. namaquensis*, die enigste parasiet van *X. laevis* wat al ooit van 'n gasheer buite die genus *Xenopus* aangeteken is (Dollfus, 1968; Mettrick, 1963).

Verlies aan parasietspesies is nie die enigste faktor wat tot die eiesoortigheid van die parasietgemeenskappe van die indringergashere bydra nie. Ten minste een parasiet, *P. xenopodis*, toon verlaagde voorkomsyfers in die indringerbevolkings van die gasheer. Tesame met die feit dat die gesommeerde voorkomsyfers, 'n aanduider van die kumulatiewe effek van parasitisme, óók laer in die indringergebied in vergelyking met die natuurlike gebied is, blyk dit dat daar 'n vorm van vrystelling van die effek van parasitisme in die vreemde gebied plaasgevind het (Torchin *et al.*, 2003). Dit moet egter met groot versigtigheid gestel word (Prior *et al.*, 2015; Prior & Hellmann, 2015). Nie net mag die waardes onakkuraathede as gevolg van die oneweredigheid van die monsternemingspogings van hierdie studie bevat nie (Jovani & Tella, 2006), maar verlaagde vlakke van parasitisme is nie direk tot 'n toename in indringersukses vertaalbaar nie, veral in die geval van *X. laevis* wat oor talryke ander eienskappe wat indringervermoë kan aanwakker, beskik (Rödder *et al.*, 2017). Die verkryging van parasiete gedurende vestiging in 'n nuwe gebied kan mettertyd ook heeltemal die effekte van parasietverlies teenwerk (Kołodziej-Sobocińska *et al.*, 2018; Schultheis *et al.*, 2015). Uiteindelik mag nuut verkrygde parasiete selfs bydra tot die bevolkingsbeheer van *X. laevis* in die indringergebied, omdat die assosiasie met die gasheer baie meer onlangs is, hoër virulensie tot gevolg kan hê (Dunn *et al.*, 2012; Ricklefs, 2010).

Einde ten laaste demonstreer hierdie studie dat daar 'n algemene tendens van metasoönparasietvrystelling, beide ten opsigte van spesierykheid en -voorkomsyfers, is wat voorkom in *X. laevis* gedurende indringing en wat nog nie deur die verkryging van nuwe parasiete teengewerk is nie. Hierdie proses word oor kontinente en selfs in die voortdurend veranderende landskap van die natuurlike gebied herhaal. Op gelykerwyse as twee soortgelyke studies op die protosoönparasiete van voëls en die metasoönparasiete van

krustaseë (Marzal *et al.*, 2011; Torchin *et al.*, 2001), steun die herhaaldelike verlies aan metasoönparasiete oor onafhanklike geografiese replikate die ERH, ongeag van kontinent, klimaat, meganisme van parasietverlies of indringingsgeskiedenis. Die assessering van ko-indringende parasiete word selde in beheerprogramme in ag geneem, behalwe as die betrokke parasiete hoogs patogenies is. Nietemin moet die rol van parasiete in biologiese indringing nie onderskat word nie, omdat beide gasheer én begeleidende parasiete ekosisteme en trofiese interaksies ten diepste in die indringergebied kan verander (Amundsen *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2012; Roy & Lawson Handley, 2012). Op lange laas moet ons besef dat die begeleidende parasiete van *X. laevis* ook indringers in eie reg is. Die vermoë om die toekomstige verskynings van hierdie parasiete te voorspel, is ‘n belangrike stap in die beheer van *X. laevis* as ‘n indringerpakket.



Hoofstuk 5

Die uiteenlopende reaksies van koïngevoerde parasiete tot die gebiedsuitbreiding van hulle wêreldwye indringerpaddagasheer

5.1 Inleiding

Biologiese indringing is die verskuiwing van organismes verby die grense van hulle natuurlike verspreidings na areas waar nuwe bevolkings vestig en uitbrei (Blackburn *et al.*, 2011). In die Antroposeen sien ons 'n toename in biologiese indringing en die nadelige gevolge wat daarmee gepaardgaan op so 'n wyse dat die verspreiding van ons flora en fauna op aarde heeltemal herskryf word (Bar-On *et al.*, 2018; Blackburn *et al.*, 2019; Capinha *et al.*, 2015; Ricciardi, 2007). Een aspek van hierdie skommeling van die biomassa wat nie net vir die oog verberg is nie, maar ook in indringernavorsing oorgesien word, is koïngevoerde parasiete (Blackburn & Ewen, 2017).

Selfs al haal die meerderheid van parasiete nie die paal gedurende die proses van indringing nie (Torchin *et al.*, 2003), kan ons steeds met redelike sekerheid aanneem dat hulle 'n aardige breukdeel van alle uitheemse spesies op die planeet uitmaak (Blackburn & Ewen, 2017). Om die waarheid te sê, vir elke gasheerspesie wat 'n nuwe area indring, is daar 'n gemiddeld van drie begeleidende parasietspesies (Torchin *et al.*, 2003). 'n Uitstekende voorbeeld hiervan is die wêreldwye indringeramfibie *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae), wat juis deur minstens drie spesies uit sy natuurlik geassosieerde metasoönparasietfauna na verskeie dele van die vreemde gebied vergesel is (oorsig in Schoeman *et al.*, 2019). In die besonder blink die sestode *Cephalochlamys namaquensis*

(Cohn, 1906) (Cestoda: Cephalochlamydidae) en die monogeneër *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) uit as die twee mees dikwels geassosieerde parasiete.

Desondanks oorvereenvoudig 'n blote vergelyking van parasietspesierykheid tussen die natuurlike en vreemde gebiede van die gasheerspesie grotendeels die kompleksiteit van die parasietdinamiek in beide die inheemse en uitheemse gasheerbevolkings (Dunn & Hatcher, 2015; Poulin, 2007). Akwatiese parasietgemeenskappe toon nie ruimtelike eenvormigheid nie (Poulin, 2007) en ons verstaan van die dryfvere van parasietdinamiek gedurende gashere se gebiedsuitbreiding is maar skraps (Blackburn & Ewen, 2017). Die onlangse vergelyking van die parasietkomponentgemeenskappe van *X. laevis* tussen sy natuurlike en vreemde gebiede het omvangryke ruimtelike veranderlikheid in parasietdinamiek aan die lig gebring, selfs meer opvallend in die natuurlike as in die vreemde gebied (Schoeman *et al.*, 2019). Een van die mees treffende bevindinge van hierdie studie was dat bevolkings van *X. laevis* van minder ongerepte liggings in die natuurlike gebied parasietgemeenskappe gehuisves het wat meer soortgelyk aan dié van indringer-*X. laevis* as aan hulle inheemse eweknieë van meer ongerepte liggings was (Schoeman *et al.*, 2019).

Hierdie padda is alombekend vir sy vermoë om ewenwel meer as minder versteurde waterliggame in sy natuurlike gebied in suidelike Afrika te koloniseer, waar dit dikwels via oorlandse migrasie of uitbreiding via mensgemaakte waterweë as pionierspesie opdaag (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2016). Sy wydverspreide verplasing word sekerlik deur antropogeniese aktiwiteite aangehelp, wat selfs doelbewuste langafstand verplasing insluit (Measey *et al.*, 2017; van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Vandaar is dit geen verrassing dat sommige bevolkings van inheemse *X. laevis* parasietgemeenskappe wat ooreenstem met dié van verplaasde en uitbreidende bevolkings van *X. laevis* in die vreemde gebied akkommodeer nie. Tog is die dryfvere van hierdie gedeelde patrone veel moeiliker om te onderskei en talle faktore is al as verklarings vir heterogeneïteit in parasitisme gebied.

Aan die een kant word daar bespiegel dat intrinsieke faktore, soos gasheerkenmerke, die aantal en verskeidenheid van die parasiete wat deur 'n enkele gasheer gedra kan word, kan beïnvloed. Deur die bank het die aanwending van eilandbiogeografieteorie tot die parasietgemeenskapsrykheid die effek van gasheereienskappe op die koers van parasietkolonisering en -uitwissing onderstreep (Poulin & Morand, 2004). Veral gasheerliggaamsgrootte, 'n aanduider van ouderdom en blootstelling en verteenwoordigend van 'n meer diverse, hulpbronryke omgewing, tree as 'n goeie bepaler van parasietspesierykheid in verskeie amfibiese gashere na vore (Campião *et al.*, 2015).

Aan die ander kant kan ekstrinsieke faktore, daardie wat voortspruit vanaf die omgewing en nie die gasheer nie, invloedryk wees in die vorming van parasitisme. Desnieteenstaande

is die effek van die omgewing kompleks en selfs teenstrydig, veral wanneer daar meer as een gasheer in die lewensiklus van ’n parasiet betrokke is (Hartson *et al.*, 2011). In die geheel neig die parasietgemeenskappe van paddas om ryker aan spesies met hoër veelheid per spesie in meer natuurlike varswateromgewings te wees (Hartson *et al.*, 2011), maar dit kan sterk van die spesifieke parasietspesie afhang (King *et al.*, 2007).

Laastens kan gebiedsuitbreiding en die gepaardgaande ruimtelike sortering in sowel gasheer as parasiet ook aanleiding gee tot verandering van die parasietgemeenskappe van indringerpaddas (Kelehear *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2021). Gevolglik ervaar gashere op die gebiedsrand van ’n uitbreidende bevolking verlaagde parasitisme, ’n fenomeen wat vir ’n wye reeks indringergasheertaksa bevestig is (Barnett *et al.*, 2018; Coates *et al.*, 2017; Coon & Martin, 2014; Phillips *et al.*, 2010; Stuart *et al.*, 2020).

Biologiese indringing bied wydverspreide natuurlike eksperimente, in sommige gevalle selfs onafhanklike wêreldwye replikate, wat die binnewerking van die natuur kan ontbloot (Blackburn, 2008). Die verstaan van die ruimtelike deel van parasietdinamiek gedurende gebiedsuitbreiding laat ons toe om die reaksies van gasheer-parasiet-sisteme tot aardverandering te voorspel (Poulin, 2007). In hierdie opsig voorsien *X. laevis* en sy parasiete, beide in die natuurlike gebied van Suid-Afrika, waar dit gereeld verplaas word, en in die vreemde gebied in westelike Frankryk, waar die uitbreiding deeglik aangeteken is, ons van ’n ideale model. In die afgelope 40 jaar sedert sy invoering na westelike Frankryk het die vreemde gebied van *X. laevis* in hierdie area tot ongeveer 4 000 km^2 gegroei (Vimercati *et al.*, 2020). Menige studies van hierdie indringerbevolking van *X. laevis* het gewys dat ruimtelike sortering in kenmerke wat aan uitbreiding en voortplanting gekoppel word, wel plaasgevind het, selfs teen hierdie betreklik klein ruimtelike en geografiese skaal (Courant *et al.*, 2017, 2019a,b; Louppe *et al.*, 2017, 2018).

Ons studie het op die parasiete van *X. laevis* in hierdie twee gebiede gefokus en die dryfvere van parasitisme, in die besonder op die effek van gebiedsuitbreiding, ondersoek. Ten eerste, om die tendense in die natuurlike parasietekologie van *X. laevis* regoor Suid-Afrika uit te pluis, het ons vasgestel of intrinsieke of ekstrinsieke faktore die meeste tot die veelheid van die twee mees algemene parasietspesies en die verdringing in die parasietinfragemeenskappe as ’n geheel bydra. Ten tweede, om moontlike ekstrinsieke faktore wat natuurlike parasietekologie in *X. laevis* kan affekteer, uit te wys, het ons die variasie in parasietveelheid en -verdringing aan die hand van die breër habitattipes van die bestudeerde liggings geïnterpreteer. Ten derde, om die effek van die gebiedsuitbreiding van *X. laevis* op parasietdinamiek vas te pen, het ons die verhouding tussen die afstand van die invoerpunt en die veelheid van die algemene parasietspesies en die verdringing van die parasietinfragemeenskappe in die vreemde gebied van westelike Frankryk geanaliseer.

5.2 Metodes

5.2.1 Gasheerversameling

Van Maart 2017 tot November 2019 is 186 volwasse *X. laevis* vanaf 31 waterliggame regoor Suid-Afrika versamel (Figuur 5.1; Bylaag A vir breedvoerige inligting oor vindoorde). Tregterfuike met leweraas is gebruik om die paddas oornag te vang. Paddas is tot en met 43 dae (mediaan = 5 dae) voor disseksie in water vanaf die versamelbron aangehou, wat met ongechloreerde water vervang is indien nodig.

Buiten die versameling in die natuurlike gebied is 114 volwasse *X. laevis* vanaf Mei tot Julie 2019 in 11 waterliggame in die vreemde gebied in westelike Frankryk teen ’n reeks afstande vanaf die invoerpunt versamel (Figuur 5.1; Bylaag A vir breedvoerige inligting oor vindoorde). Paddas is in geaasde fuike deur lede van die EU LIFE CROAA-span versamel onder die vaandel van die plaaslike uitroeiingsprogram vir indringeramfibieë. Ná versameling is die paddas saam met ander van dieselfde ligging aangehou in plastiekakwaria gevul met verouderde gechloreerde kraanwater. Parasietsifting het plaasgevind vanaf die versameldag tot en met twee weke ná versameling (mediaan = 7 dae).

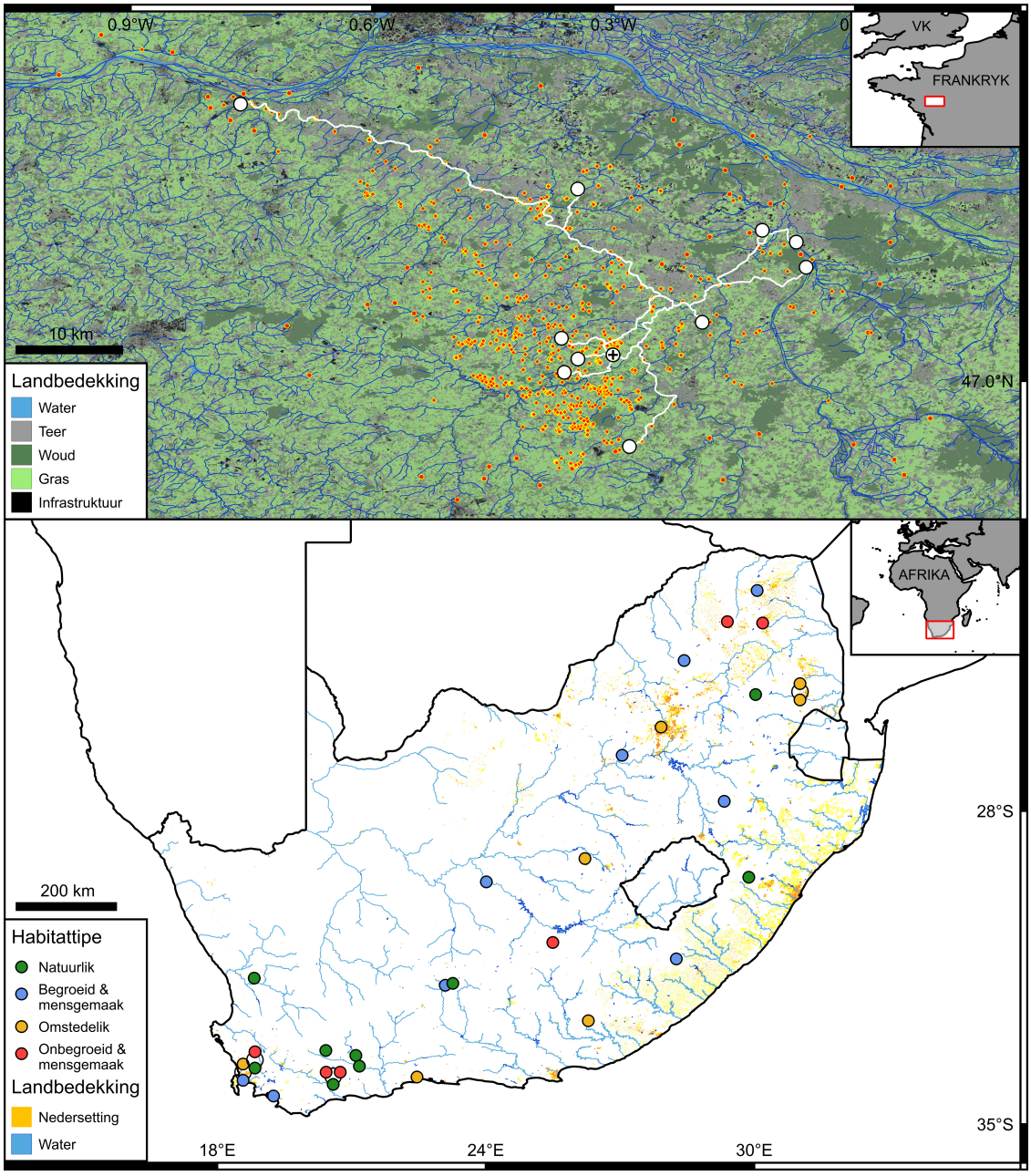
In die aanloop tot disseksie het alle paddas dubbele eutanasie ondergaan met verdowing in 6% etiel-3-aminobensoaat metaansulfonaat (MS222) (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) gevolg deur deserebrasie. Die geslag van die dooie paddas is bepaal, hulle is geweeg en die lengte van snoet na urostiel (SVL) is opgeteken.

Teopaslike institusionele, nasionale en internasionale riglyne vir die aanhouding en gebruik van diere is onder die Noordwes-Universiteit se AnimCare-etieknommer NWU-0380-16-A5-01 gevolg. Die datastel vir die huidige studie is as deel van ’n groter projek met die doel om die parasietfauna van *X. laevis* in Suid-Afrika en westelike Frankryk te karakteriseer, verkry.

5.2.2 Parasietversameling en -identifikasie

Dooie paddas is beide aan die buite- en binnekant vir metasoönparasiete ondersoek. Uitwendige ondersoek het die vel, webbe tussen die tone, oë, neusgate, Eustachiusbuisies en mondholte ingesluit. Paddas is aan hul onderkant oopgesny en die hart met intakte sakkie, longe, lewerlobbe, galsblaas en -buisies, uitskeidingsblaas, spysverteringskanaal van slukderm tot rektum en nier is verwyder, afsonderlik in 0.6% Ringer se amfibieërsoutoplossing (du Preez & van Wyk, 2007) geplaas en onder ’n stereomikroskoop ondersoek.

Die waargenome parasiete is versigtig verwyder, getel, gefikseer en gepreserveer in 70% molekulêre graad etanol. Volwasse sestode en digeneërs is in kraanwater met hitte onder



Figuur 5.1: Verspreiding van vindoorde (gekleurde sirkels) in westelike Frankryk (bo) en Suid-Afrika (onder) waar volwasse *Xenopus laevis* tesame met hulle metasoönparasietversamelings bymekaargemaak is. Heersende grondgebruik van elke 25 m^2-koördinaatnetsel in Frankryk, volgens Vimercati *et al.* (2020), word saam met waterweë, afgelei van BD CARTHAGE® *weergawe* 3.0, aangedui. Die geskiedkundige invoerligging (swart kruisie) en voorkomsdata (oranje kolletjies; Vimercati *et al.*, 2020)van indringer-*X. laevis* word aangetoon. Wit lyne dui die berekende weë van geringste koste tussen die invoerligging en elke vindoord in Frankryk aan. In Suid-Afrika word die hoofwaterliggame en menslike bevolkingsdigtheidsdata, verkry vanaf die 2012 databasis vir die Waterhulpbronne van Suid-Afrika, aangetoon. Klassifikasie van habitattipes van die waterliggame by die Suid-Afrikaanse liggings is op eie waarnemings en die 2018 Suid-Afrikaanse Nasionale Landbedekkingsdatastel gebaseer. Die kaart is in QGIS *weergawe* 3.10.2-A Coruña (QGIS Development Team, 2018) met die Mercator-projeksie opgetrek.

'n dekglasie van kant gemaak. Geïnsisteerde lintwurms en digeneërs is versigtig met skerp naalde uitgehaal en direk in 70% etanol geplaas. Monogeneërs is in 'n druppel kraanwater op 'n mikroskoopskyfie geplaas wat liggies van onder af met 'n butaanvlam verhit is totdat die wurm uitgestrek het, na aanleiding van Snyder & Clopton (2005). 'n Dekglasie is oor die wurm geplaas en die kraanwater is geleidelik met 70% etanol vervang. Nematode is in warm 70% etanol gefikseer. Myte en bloedsuiers is direk in 70% etanol geplaas.

Etlike van die parasieteksemplare in ons datastel is al voorheen in vorige analises wat deel uitgemaak het van hierdie voortslepende opname van die parasietfauna van *X. laevis*, uitgeken (Schoeman *et al.*, 2019, 2020; Svitin *et al.*, 2018). Met die ekologiese analises as oogmerk is eksemplaaruitkenning slegs nodig vir die monogeneër *P. xenopodis* en die sestode *C. namaquensis*. Hierdie morfologies opvallende spesies is uitgeken aan hulle morfologiese eienskappe soos dit onder ligmikroskopie waargeneem is, asook infeksieplek en gasheeridentiteit. Die res van die parasiete – digeneër-, monogeneër-, myt- en bloedsuierspesies wat as volwassenes die padda parasiteer – kon van mekaar onderskei word en kon in die meeste gevalle uitgeken word op grond van morfologie onder ligmikroskopie en infeksieplek in die liggaam. Nematode is met behulp van molekulêre en morfologiese hulpmiddels net soos in vorige studies uitgeken (Schoeman *et al.*, 2020; Svitin *et al.*, 2018). Die molekulêre benadering van Schoeman *et al.* (2019) is aangewend om tussen die digeneërmetaserkarieë wat in die huidige studie herwin is met die tussengetranskribeerde skeiergeenstreek (*ITS*) te onderskei in gevalle waar morfologiese ondersoek nie genoegsaam was nie.

5.2.3 Berekening van geskaleerde massaïndeks

Gasheertoestand is deur middel van die geskaleerde massaïndeks (SMI), 'n akkurate liggaamstoestandsindeks vir Anura, insluitend *X. laevis* (Brodeur *et al.*, 2020; Courant *et al.*, 2017; MacCracken & Stebbings, 2012), afgelei. Pleks daarvan dat dit vanaf die gewone kleinste kwadraatregressie van liggaamsmassa teenoor SVL afgelei word, maak die SMI staat op gestandaardiseerde hoofasregressie (SMA) (Peig & Green, 2009). Die SMA lewer 'n beter beraming van liggaamstoestand in Anura, veral in die geval van heteroskedastiese en oormatig verspreide data waar paddas van verskillende bevolkings of liggings afkomstig is (Jakob *et al.*, 1996; Peig & Green, 2010). Die SMI, aangedui deur $\hat{M}_i$, word deur die volgende formule bereken:

$$\hat{M}_i = M_i \cdot \left(\frac{L_0}{L_i} \right)^{b_{SMA}}$$

waar M_i die massa en L_i die SVL van padda i is, L_0 die gemiddeld van al die paddas in die monster is en die skaalfaktor b_{SMA} die helling van die SMA-regressie van liggaamsmasse

en SVL, beide deur die dekadiese logaritme getransformeer, is.

Om die SMI vergelykbaar tussen liggings en geslagte te maak, moet die SMI van alle paddas tot dieselfde lengte (L_0) gestandaardiseer word, wat enige lukrake waarde soos deur die navorser gekies kan wees (Peig & Green, 2009). In gevalle waar die helling van die SMA nie beduidend tussen die groepe in die monster verskil nie, kan mens vol vertroue 'n enkele skaalfaktor benut om die SMI van die hele monster te bereken (Brodeur *et al.*, 2020; Peig & Green, 2009). Die R-pakket *smatr* (Warton *et al.*, 2012) word geredelik in allometrie gebruik om tweeveranderlike lyne deur die SMA te pas. Die funksie `sma()` kan boonop vir gemeenskaplike helling tussen verskeie SMA-regressies, afsonderlik gepas vir elke peil van die groeperingsfaktor, toets (Warton & Weber, 2002). Dus het ons die SMA van die dekadiese logaritmes van massa teenoor SVL gepas om die hellings tussen mannetjies en wyfies te vergelyk terwyl 'n gemeenskaplike afsnit aangeneem is. In die afwesigheid van noemenswaardige uitskieters was dit nie nodig om die robuuste weergawe van die regressie uit te voer nie (Taskinen & Warton, 2011).

Regressiehelling was nie beduidend verskillend tussen mannetjies en wyfies in Suid-Afrika ($LR_{df=1}$ = 3.536, $p > 0.05$) of Frankryk ($LR_{df=1}$ = 2.821, $p > 0.05$) nie. Dus is 'n b_{SMA} van 2.62 (95% CI [2.514; 2.732], R^2 = 0.92, $p < 0.001$) as skaalfaktor aangewend om die SMI van paddas in Suid-Afrika te bereken en 'n b_{SMA} van 2.84 (95% CI [2.767; 2.918], R^2 = 0.98, $p < 0.001$) in die geval van die paddas van Frankryk. Die SMI is aan die hand van die gemiddelde SVL van die Franse monster (L_0 = 66 mm) as lukraak gekose getal gestandaardiseer. Die berekende SMI het nie met SVL in paddas van Suid-Afrika (Spearman se ρ = -0.088, $p > 0.05$) en Frankryk (Spearman se ρ = -0.064, $p > 0.05$) gekorreleer nie.

5.2.4 Habitatklassifikasie in die natuurlike gebied

Habitatte by die onderskeie vindoorde in Suid-Afrika is in vier hoofgroepe verdeel op grond van sowel waarnemings by die ligging gedurende versameling as 'n assessering van die oorwegende grondbedekking in 'n 1 km radius rondom elke ligging, afgelei via sonale statistiek in QGIS *weergawe* 3.10.2-A Coruña (QGIS Development Team, 2018) van die 2018 Suid-Afrikaanse Nasionale Landbedekkingsdatastel (SANLC) (https://egis.environment.gov.za/gis_data_downloads). Hierdie kategorieë is (1) Omstedelik: waterliggame binne 1 km vanaf stedelike nedersettings, (2) Onbegroeid & mensgemaak: mensgemaakte waterliggame met weglaatbare plantegroei en (3) Begroeid & mensgemaak: baie plantegroei en (4) Natuurlik: natuurlike of gevestigde mensgemaakte waterliggame in natuurlike riviersisteme.

5.2.5 Berekening van weë van die geringste koste vanaf invoerpunt in die vreemde gebied

Plasing op die indringergolf is as 'n moontlike bepaler van parasitisme uitgelig. Derhalwe is die vindoorde in Frankryk noukeurig gekies om 'n reeks afstande vanaf die invoerpunt van *X. laevis* – 'n munisipale dam langs die geslote broeifasiliteit van *X. laevis* naby die dorpie van Bouillé-Saint-Paul (Fouquet, 2001) – te lê. Ons kon dus nie liggings tussen middelpunt- en randliggings verdeel soos wat in vorige ondersoeke van *X. laevis* in hierdie streek gedoen is nie (Courant *et al.*, 2017, 2018, 2019a,b; Louppe *et al.*, 2017, 2018). Geskiedkundige uitbreiding vanaf die invoerpunt deur die padda het ook nie noodwendig eweredig na alle kante toe plaasgevind nie, met groter uitbreiding na die noordweste (Vimercati *et al.*, 2020). In die lig van hierdie oneweredige uitbreiding het ons eerder weë van die geringste koste ("soos die padda hop") vanaf die invoerpunt tot by elke vindoord as fisiese afstand ("soos die kraai vlieg") bereken.

Analise van die weg van die geringste koste (LCPA) is op 'n spesie-spesifieke koste-van-beweging-raster van *X. laevis* in westelike Frankryk geskoei. 'n Ruimtelike koördinaatnet van die oorwegende grondbedekking van elke 25 m^2-kwadrant in die gebied van 35° 16' 33.894" N tot 46° 46' 20.261" N en 1° 42' 26.803" W tot 6° 51' 34.615" E, wat die hele uitheemse bevolking van *X. laevis* in westelike Frankryk omsluit, is vanaf Vimercati *et al.* (2020) bekom (Figuur 5.1). Gestandaardiseerde weerstandskostes van *X. laevis* vir elke grondbedekkingstipe, verkry vanaf Vimercati *et al.* (2021), is op die koördinaatnet gelê om 'n koste-raster vir die LCPA te skep. Na dese is riviere en waterliggame 'n gestandaardiseerde weerstandskoste van 1.5 toegeken, teer en kaal grond 'n koste van 5, woude en blaarbedekking 'n koste van 7.5, gras 'n koste van 11 en geboue en ander onoorbrugbare infrastruktuur 'n koste van 999.

As eerste stap van die LCPA is die koste-raster omgeskakel tot 'n oorgangsmatriks wat geleidingswaardes bevat het. Hierdie is bereken as die omgekeerde van die rekeningkundige gemiddeldes van die kostewaardes van naburige selle in 'n Moore-omgewing. Matrikswaardes is verstel vir afstandsverwringing in die Oos-Wes-rigting en oor diagonale verbindings tussen selle. Die berekening van die afstande van geringste koste vanaf die invoerpunt tot by elk van die 11 vindoorde is met behulp van Dijkstra (1959) se algoritme bereken. Alle stappe van die LCPA is met die R-pakket *gdistance* (van Etten, 2017) uitgevoer wat op die R-pakket *igraph* (Csárdi & Nepusz, 2006) staatmaak vir onderliggende bewerkinge.

5.2.6 Kwantifisering van parasitisme

Met die bedoeling om die faktore wat die algehele parasitisme van 'n enkele gasheer beïnvloed, te bepaal, is elke gasheer se infragemeenskap verskraal tot 'n enkel absolute

maatstaf wat beide spesierykheid en -gelykheid weerspieël. Die infragemeenskapsverdringingsindeks (ICr-indeks), soos uiteengesit deur Ferrari *et al.* (2016), bou op 'n konsep van verdringing wat deur Lloyd (1967) ontwikkel is. Verdringing, volgens Lloyd (1967), kwantifiseer die aantal individuele parasiete waarmee 'n enkele parasietindividu van dieselfde spesie in kontak kom. Die ICr-indeks vat hierdie basiese konsep verder tot op die interspesifieke vlak (Ferrari *et al.*, 2016). In wese werk die ICr die gemiddelde verdringing van elke parasietspesie vanaf individue van ander parasietspesies in 'n gasheer uit teenoor die totale aantal individuele parasiete in 'n gasheer. Dit lewer die verdringing wat deur die gemiddelde parasietspesie in 'n gegewe gasheer se infragemeenskap ervaar word volgens hierdie formule:

$$ICr = \frac{2 \cdot \sum_{j=1}^{S-1} \left(x_j \cdot \sum_{i=j+1}^{S} x_i \right)}{N}$$

Hier is x_j die veelheid van die j-ste parasietspesie, S is die metasoönparasietspesierykheid en N is die algehele metasoönparasietveelheid. Omdat verarmde infragemeenskappe in beide die inheemse en uitheemse bevolkings van *X. laevis* gevind kan word (Schoeman *et al.*, 2019), het ons 'n paar teëgekom met geen parasiete nie, wat tot 'n ongedefinieerde ICR-indeks vir sommige infragemeenskappe gelei het. Om in die analises hiervoor te vergoed het ons een skynparasietindividu tot die algehele parasietveelheid van elke gasheer gevoeg. Die ICr-indeks met of sonder die skynparasiet het byna volmaakte korrelasie getoon in beide die Suid-Afrikaanse (Spearman se ρ = 0.999, $p < 0.001$) en die Franse opname (Spearman se ρ = 0.998, $p < 0.001$), wat die toevoeging van die skynparasiet geregverdig het.

5.2.7 Seleksie van voorspellers

In die aanloop tot die analise het ons al die beskikbare voorspellers versigting betrag om hipoteses oor die studiesisteem te weerspieël (Harrison *et al.*, 2018). Derhalwe is slegs voorspellers wat van toepassing was op die probleemstelling ingesluit, eerder as al die beskikbare veranderlikes (Burnham & Anderson, 2002; Harrison *et al.*, 2018). Die is veral 'n oorweging by kleiner datastelle waar mens jou skuldig kan maak aan oormatige parameterisasie. Daarby het ons verseker dat die gekose voorspellers onafhanklik tot die variansie in die responsveranderlikes bydra (Zuur *et al.*, 2010). In gevalle waar veranderlikes kollineêr was, het ons die mees biologies betekenisvolle veranderlike geselekteer (Zuur *et al.*, 2010).

Vir die modelle wat op die Suid-Afrikaanse datastel uitgevoer is, het ons slegs SMI en SVL as vaste effekte beskou. Massa is nie ingesluit nie, aangesien massa met beide SMI (Spearman se ρ = 0.175, p = 0.02) en SVL (Spearman se ρ = 0.957, $p < 0.001$)

gekorreleer het. Geslag is voorts ook nie oorweeg nie, omdat beide SVL (W = 5974.5, $p < 0.001$) en SMI (W = 2862, $p < 0.001$) beduidend tussen mannetjies en wyfies verskil het. Vervolgens kon die effek van geslag nie losgemaak word van tweevormigheid in liggaamsgrootte en -toestand nie.

In die uitheemse bevolking in westelike Frankryk het die massa van al die gemete paddas met SVL (Spearman se ρ = 0.987, $p < 0.001$) gekorreleer en is dit nie as voorspeller by enige van die modelle ingesluit nie. Beduidende korrelasie tussen afstand van die invoerligging en beide SVL (Spearman se ρ = -0.249, p = 0.008) en SMI (Spearman en ρ = -0.191, p = 0.04) kon opgemerk word. Aangesien afstand van die invoerpunt ons voorspeller van belang is, het ons slegs afstand as 'n vaste effek in ons modelle wat op die Franse datastel uitgevoer is, ingesluit om moontlike multikollineariteit en oormatige passing te vermy (Harrison *et al.*, 2018).

Vindoord is as 'n stogastiese effek in alle modelle wat op die Suid-Afrikaanse en Franse datastelle uitgevoer is, geïnkorporeer. Die invoeging van vindoord as 'n stogastiese effek het ons toegelaat om van die inherente genesteldheid van ons datastelle en klein groepgroottes rekenskap te gee (Gelman & Hill, 2006; Zuur & Ieno, 2016). Daarbenewens was die variasie tussen die liggings in ons datastelle van belang omdat dit ongemete omgewings- of demografiese veranderlikheid voorstel (Harrison *et al.*, 2018).

5.2.8 Statistiese analises

Alle kontinue voorspellers is geskaleer en gesentreer na 'n gemiddeld van nul en 'n standaardafwyking van een voor die analises (Schielzeth, 2010). Daarby is waarnemings met uitgelate waardes vanuit beide datastelle verwyder. Die uieindelike twee datastelle het 176 paddas van 31 liggings in die natuurlike gebied (113 wyfies en 63 mannetjies) en 105 paddas van 10 liggings in die vreemde gebied (59 wyfies and 54 mannetjies) bevat. Ses veralgemeende lineêre gemengde modelle (GLMM'e) is uitgevoer om die verwantskappe tussen die parasietladings wat deur individuele *X. laevis* in beide die natuurlike en vreemde gebiede ervaar is as responsveranderlikes en intrinsieke en ekstrinsieke faktore as voorspellerveranderlikes te ontdek.

Die ICr-indeks is 'n kombinasie van diskrete presiese nulle en 'n positief skewe kontinue verdeling van positiewe waardes, 'n situasie wat dikwels in digtheids- en relatiewe veelheidsdata van organismes, ook parasiete, aangetref word (bv. Canel *et al.*, 2019). As monsternemingstoestande tussen liggings verskil, word 'n spesifieke geval van die Tweedie-familie van verdelings benut (Jørgensen, 1997), naamlik die Poisson-Gamma met 'n indeksterm in die gemiddeld-variansie-verhouding $V(\mu) = \phi\mu^p$ van $1 < p < 2$ (Dunn & Smyth, 2005; Jørgensen, 1997; Smyth, 1996). In gevalle waar monstervolumeveranderlikheid egter min is, lewer die hekkie-Gamma-benaderings vergelykbare resultate en dit

is boonop heelwat makliker om uit te voer (Lecomte *et al.*, 2013). Om oplaas die aantal intraspesifieke interaksies van elke parasietinfragemeenskap (ICr-indeks) as ’n funksie van SMI en SVL as vaste effekte en vindoord as stogastiese effek in Suid-Afrika en as ’n funksie van afstand vanaf die invoerligging as vaste effek en vindoord as stogastiese effek in Frankryk te modelleer, is twee log hekkie-Gamma LMM’s met ’n log-skakelfunksie uitgevoer.

Oormatig verspreide tellingdata waarvan die variansie groter is as die gemiddeld word goed deur die negatiewe binomiaalverdeling benader. Om dié rede is die veelhede van *P. xenopodis* en *C. namaquensis* van westelike Frankryk in twee GLMM’e volgens die negatiewe binomiaalverdeling met ’n log-skakelfunksie gemodelleer. Afstand vanaf die invoerligging is as vaste effek en vindoord as stogastiese effek ingesluit in beide hierdie GLMM’e.

Aangesien die bogenoemde parasiete nie by alle liggings in Suid-Afrika gevind is nie, kon nulle teoreties in die datastel voorkom weens ware afwesigheid van ’n parasiet by die ligging, of omdat die paar gashere wat ondersoek is by die ligging nie geïnfekteer is nie, al kom die parasiet eintlik daar voor. Om dus vir beide ware en valse nulle in die datastel voorsiening te maak, is die veelhede van *P. xenopodis* en *C. namaquensis* in Suid-Afrika met ’n nul-geïnflateerde negatiewe binomiaalverdeling in nog twee GLMM’e gemodelleer (Martin *et al.*, 2005). Soos voorheen genoem is SMI en SVL as vaste effekte ingesluit en vindoord is as stogastiese effek gemodelleer. Die gevolglike *a posteriori*-verdelings van die stogastiese effek is aan die hand van habitattipes verklaar om moontlike ruimtelike patrone in die veelheid van *P. xenopodis* en *C. namaquensis* oor die natuurlike gebied te ondersoek.

’n Bayes-benadering is vir die GLMM’e verkies, omdat dit soomloos die onsekerheid wat met stogastiese effekte gepaardgaan by algehele parameterberaming kan inlyf (Bolker *et al.*, 2009; Ellison, 2004; Gelman & Hill, 2006). Daarby het die insluiting van swak inligtingewende priors ’n regulariserende effek op die parameters, wat beteken dat parameterberamings krimp na nul tensy die data ten sterkste ’n effek toon (Lemoine, 2019; McElreath, 2020). Dit verreken implisiet die feit dat ekologiese data ruiserig is en dat effekte oor die algemeen klein is. Die insluiting van swak regulariserende *a priori*-inligting kan ons vertroue in die uitkomste verhoog (McCarthy & Masters, 2005) terwyl dit soortgelyke beramings as frekwentistiese metodes lewer (Bolker *et al.*, 2009).

A priori-verdelings is op grond van die voorstelle van Bolker *et al.* (2009), Evans & Jang (2011), Gelman (2006), Gelman *et al.* (2008), Lemoine (2019), Polson & Scott (2012), Simpson *et al.* (2017) en Zuur *et al.* (2015) gekies. Ons het die Student se *t* (3,0,1) *a priori*-verdeling tot die modelafsnitte aangebring, die normale (0,1) *a priori*-verdeling tot die vaste effekte en die half-Cauchy (0,1) *a priori*-verdeling tot die stogastiese effek. Die verstek- *a priori*-verdelings, soos voorgestel in Bürkner (2017), is vir die familie-spesifieke

parameters gebruik.

Die Bayes-GLMM'e is met die Markov-ketting Monte Carlo-algoritme (MCMC) (Gilks *et al.*, 1996) in the R-pakket *brms* (Bürkner, 2017), 'n tussenganger vir die C++-pakket *Stan* (Carpenter *et al.*, 2017), gepas. Hierdie pakket bring die Hamilton se MCMC-metode (Duane *et al.*, 1987; Neal, 2011) en sy uitbreiding, die Geen U-Draai Monsternemer (NUTS) (Hoffman & Gelman, 2014), ten uitvoer. Modelkonvergensie is met vyf kettings van 100 000 iterasies elk, waarvan die eerste 15 000 verwerp is, bereik. Om divergerende oorgange reg te stel is die gedrag van NUTS as volg aangepas: aanvanklike stapgrootte is verminder tot 0.001, die teikenaanvaardingskoers is vermeerder tot 0.999 en die boomdiepte is vermeerder tot 20. Kettings is honderdvoud uitgedun voordat die *a posteriori*-verdelings opgesom is.

Ons het potensiële skaalreduksiefaktore en diagnostiese stippings, soos deur die R-pakket *bayesplot* (Gabry *et al.*, 2019) gelewer, geraadpleeg om modelkonvergensie te bevestig. Afwesigheid van multikollineariteit is via variansie-inflasiefaktore met die R-pakket *performance* (Lüdecke *et al.*, 2020) bevestig. Die beramings van die effekgroottes is van die *a posteriori*-verdelings van die modelparameters met die hulp van die R-pakket *bayestestR* (Makowski *et al.*, 2019) afgelei. Die 89% geloofwaardigheidsintervalle rondom die gemiddelde is gebruik om steun vir die effek van elke parameter te beoordeel. Dit word as meer stabiel as 95% geloofwaardigheidsintervalle gereken (Kruschke, 2015; McElreath, 2020). Steun vir 'n effek is aanvaar as hierdie intervalle nie die nullyn oorkruis het nie. Modelpasgehalte is met die Bayes-R^2 (Gelman *et al.*, 2019) in *performance* (Lüdecke *et al.*, 2020), wat beide die voorwaardelike en rand-R^2 bereken (Nakagawa & Schielzeth, 2013), geëvalueer.

Alle statistiese analises is in R weergawe 4.0.2 (R Core Team, 2020) met behulp van die bogenoemde pakkette uitgevoer. Wickham *et al.* (2019) se *tidyverse* en Mangiafico (2020) se *rcompanion* is deurgaans vir datatimmerwerk en berekening van opsommende statistiek gebruik.

5.3 Resultate

5.3.1 Parasietversamelings van *X. laevis* in die natuurlike en vreemde gebiede

In totaal is 25 metasoönparasietspesies in assosiasie met *X. laevis* in Suid-Afrika gedurende die huidige opname herwin. Dié spesies is uitgeken as twee sestode, twee monogeneërs, tien nematode, nege digeneërs, een myt en een bloedsuier. Die sestode *C. namaquensis* van die intestinum en die monogeneër *P. xenopodis* van die blaas is

onderskeidelik by 29 en 27 van die 31 vindoorde en in 61% en 52% van alle gashere gevind.

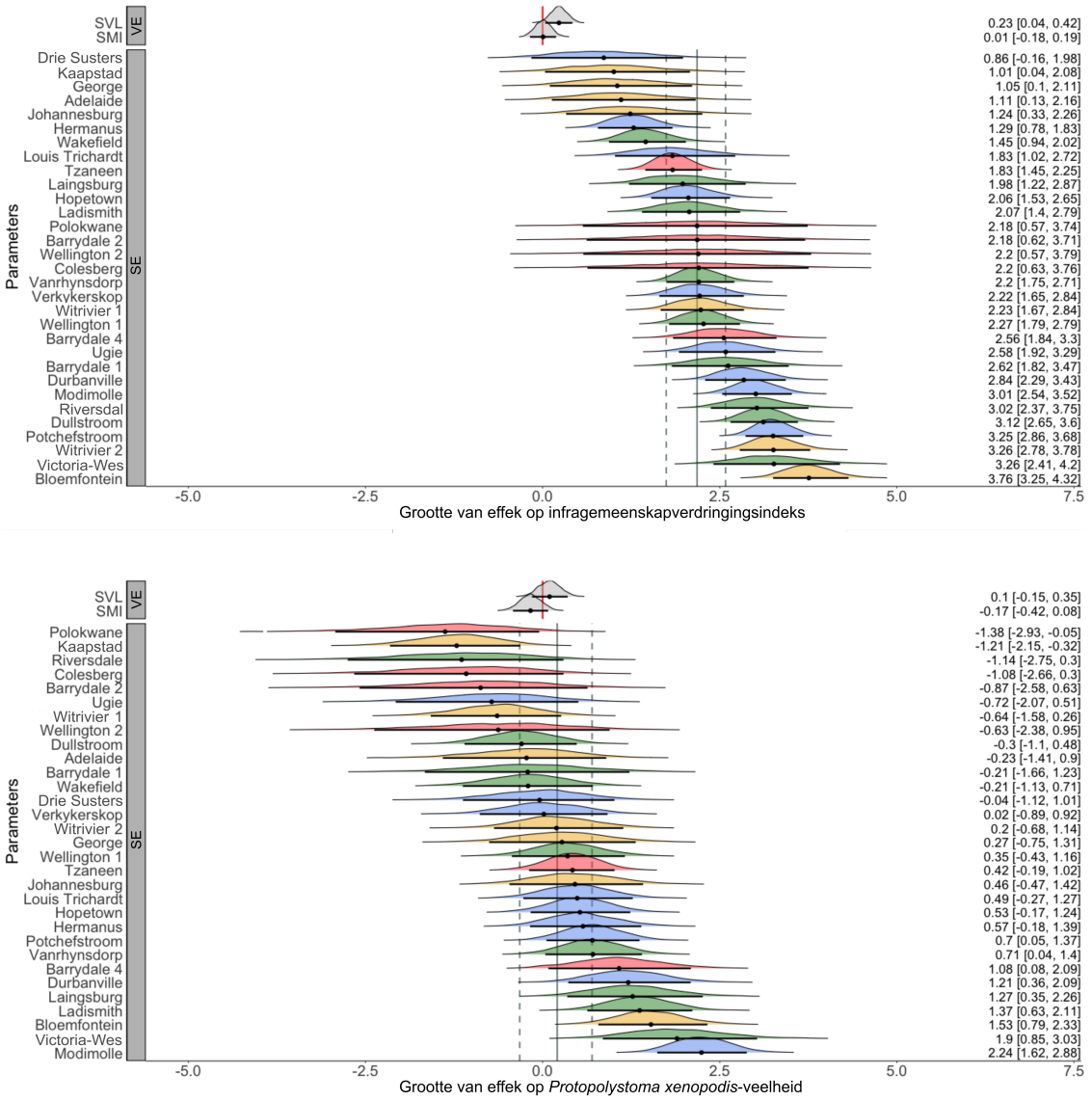
Metasoönparasietspesierykheid van die komponentgemeenskappe regoor die 31 Suid-Afrikaanse vindoorde het van nul na elf gewissel met 'n mediaan van ses spesies. In infragemeenskappe met minstens een metasoönparasiet per gasheer werk die gemiddelde metasoönparasietspesie in Suid-Afrika uit op 3.8 $\pm$ 95% CI [2.50; 6.42] parasiete wat aan ander spesies behoort, na aanleiding van die mediaan van die ICr-indeks wat sonder die skynparasiet bereken is. In lyn met die tipiese parasietverspreiding in gashere het die meeste gashere onverdringde gemeenskappe gehuisves. 'n Derde (33%) van gashere het óf geen metasoönparasiete geakkommodeer nie, óf net een.

Vyf metasoönparasiete is vanaf *X. laevis* in westelike Frankryk gedurende die huidige opname herwin. Die twee parasiete mees volop regoor die streek was altwee koïndringers van suidelike Afrikaanse oorsprong, naamlik *C. namaquensis* en *P. xenopodis*. Beide hierdie parasiete is van al 11 vindoorde herwin en het 85% van gashere geïnfekteer in die geval van die sestode en 71% in die geval van die monogeneër. Die ander drie metasoönparasietspesies, naamlik een spesie van die Nematoda en twee spesies van Digenea (teenwoordig as metaserkarieë) is altesaam van slegs 8% van alle gashere herwin. Die *ITS*-streek van een van die digeneërspesies was identies aan dié van 'n spesie wat in dieselfde stadium herwin is in sommige gashere van Suid-Afrika. Vergelyking van die 1 239 bp van die *ITS*-streek van hierdie eksemplare met volgordes wat op GenBank beskikbaar is (KP721422–39 van Caffara *et al.* (2016) en KC894798–801 van Senapin *et al.* (2014)) het getoon dat hierdie spesie aan die familie Clinostomidae en waarskynlik die genus *Euclinostomum* Travassos, 1928, behoort. Dit vlek die moontlikheid van 'n derde koïnvoering van 'n parasiet van Afrika-oorsprong saam met *X. laevis* na westelike Frankryk oop.

In gevalle waar 'n gasheer minstens een parasiet gehuisves het, het die gemiddelde metasoönparasiet in 'n infragemeenskap van *X. laevis* in westelike Frankryk met mediaanverdringing van 1.6 $\pm$ 95% CI [0.00, 1.71] parasiete ondervind. Hierdie waarde is afgelei van die ICr-indeks wat sonder die toevoeging van die skynparasiet bereken is. Die parasiete het 'n tipiese geaggregeerde verspreiding oor al die gashere gewys, met 38% van *X. laevis* se infragemeenskappe gekarakteriseer deur nul of een parasietspesies.

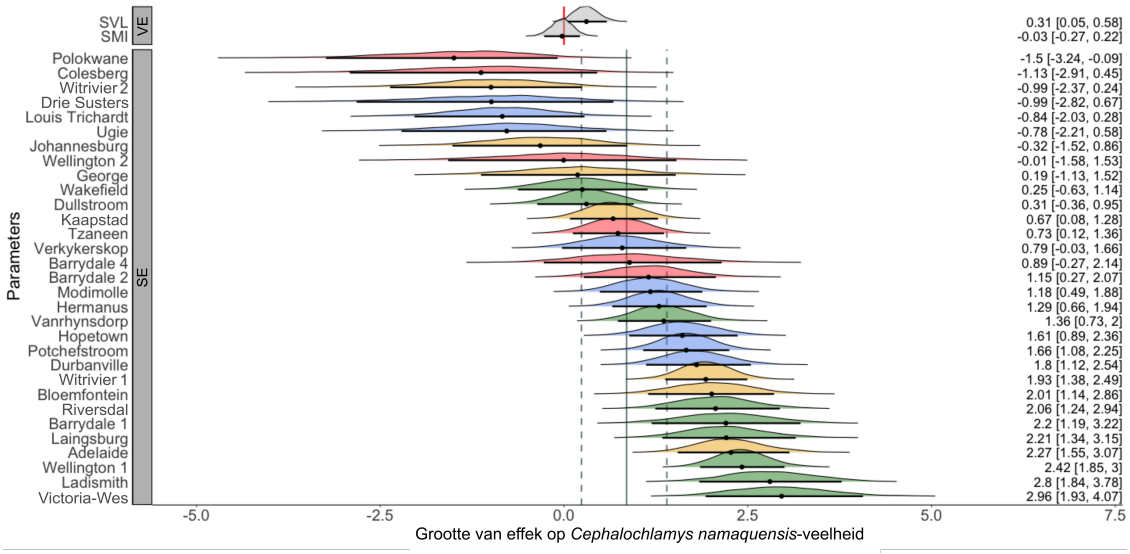
5.3.2 Intrinsieke en ekstrinsieke faktore wat parasitisme in die natuurlike gebied beïnvloed

In die natuurlike gebied het gashere met groter SVL meer verdronge parasietinfragemeenskappe as kleiner gashere gehuisves en is hulle met minder *C. namaquensis* geïnfekteer (Figuur 5.2). Daarteenoor het die lading van *P. xenopodis* nie na gelang van gasheer-SVL



Figuur 5.2: Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste effekte (VE) van die gasheer se lengte van snoet na urostiel (SVL) en die gasheer se geskaleerde massaïdeks (SMI) en die stogastiese effek van vindoord van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in Suid-Afrika as respons. Swart kolletjies dui *a posteriori*-gemiddelde en stawe dui 89% vertrouensintervalle (CI) aan, waarvan die waardes aan die regterkant van elke verdeling aangetoon word. 'n Positiewe effekgrootte (aan die regterkant van die rooi lyn) vir 'n vaste effek dui 'n toename in potensiaal tot parasitisme in verhouding met daardie vaste effek aan. In die geval van die stogastiese effek, dui 'n positiewe afwyking van die gemiddelde effekgrootte (soliede grys lyn) met 89% VI (onderbroke grys lyn) bo-gemiddelde potensiaal vir parasitisme by daardie spesifieke ligging aan. Breedte van die 89% VI verteenwoordig vertroue in die beramings. Vindoorde is ingekleur volgens habitattipe, naamlik waterliggame wat natuurlik (groen), begroeid & mensgemaak (blou), onbegroeid & mensgemaak (rooi) en omstedelik (geel) is, en is vernoem na die naaste dorp.

gewissel nie (Figuur 5.2). In die geval van die SMI het liggaamstoestand geen effek op ICr of *C. namaquensis* en *P. xenopodis*-veelhede gehad nie (Figuur 5.2). In alle gevalle het



Figuur 5.2: Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste en stogastiese effekte van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in Suid-Afrika as respons (*vervolg*).

die stogastiese effek van vindoord aansienlik meer van die veranderlikheid in parasitisme in die natuurlike gebied verklaar as die vaste effekte, soos aangedui deur die aanmerklike verskil tussen die rand- en voorwaardelike R^2 van al die modelle (Tabel 5.1).

Veral in die geval van *C. namaquensis*-veelheid, in teenstelling met ICr-indeks en *P. xenopodis*-veelheid, word 'n merkbaar groter gedeelte van die veranderlikheid deur variansie op die peil van liggings verklaar (Tabel 5.1). By nadere ondersoek van die *a posteriori*-verdelings van elke vindoord is dit duidelik dat gashere van liggings met natuurlike habitatte 'n hoër kans het om met *C. namaquensis* geïnfekteer te wees as dié van liggings met begroeide of onbegroeide mensgemaakte waterliggame of van omstedelike liggings (Figuur 5.2). Die vertrouensintervalle van die beramings vir die onbegroeide, mensgemaakte waterliggame was oor die algemeen heelwat breër as dié van die ander habitattipes (Figuur 5.2). Nietemin was infragemeenskapsverdringing nie konsekwent laer as verwag in hierdie waterliggame nie (Figuur 5.2).

5.3.3 Invloed van gebiedsuitbreiding op parasitisme in die vreemde gebied

Onder die *X. laevis* wat van die vreemde gebied in westelike Frankryk versamel is, het afstande vanaf die invoerligging nie alle parasiete in gelyke maat beïnvloed nie (Figuur 5.3). Die veelheid van *C. namaquensis* het gedaal na die rand van die gebied se kant toe (Figuur 5.3), terwyl hierdie effek nie merkbaar van nul afgewyk het in die geval van *P. xenopodis*-veelheid of infragemeenskapsverdringing nie. Verskille op die liggingspeil het die grootste invloed gehad op die veelheid van *P. xenopodis* in vergelyking met

Tabel 5.1: Bayes-R^2-waardes (Nakagawa & Schielzeth, 2013) van die ses veralgemeende lineêre gemengde modelle waar infragemeenskapsverdringing (ICr) en die veelheid van *Cephalochlamys namaquensis* (Ceph) en *Protopolystoma xenopodis* (Prot) in beide die natuurlike (ZA) en vreemde (FR) gebiede as responsveranderlikes gemodelleer is. Vaste effekte was gasheerlengte (*SVL*), gasheerliggaamsindeks (*SMI*), of weg met die geringste koste vanaf die invoerpunt in Frankryk(*afstand*). Vindoord (ligging) is as stogastiese effek gemodelleer. Rand-R^2 dui die proporsie van die veranderlikheid wat slegs deur die vaste effekte verklaar word aan, terwyl die voorwaardelike R^2 die proporsie van die totale variansie wat deur beide die vaste en stogastiese effekte verklaar word, aandui.

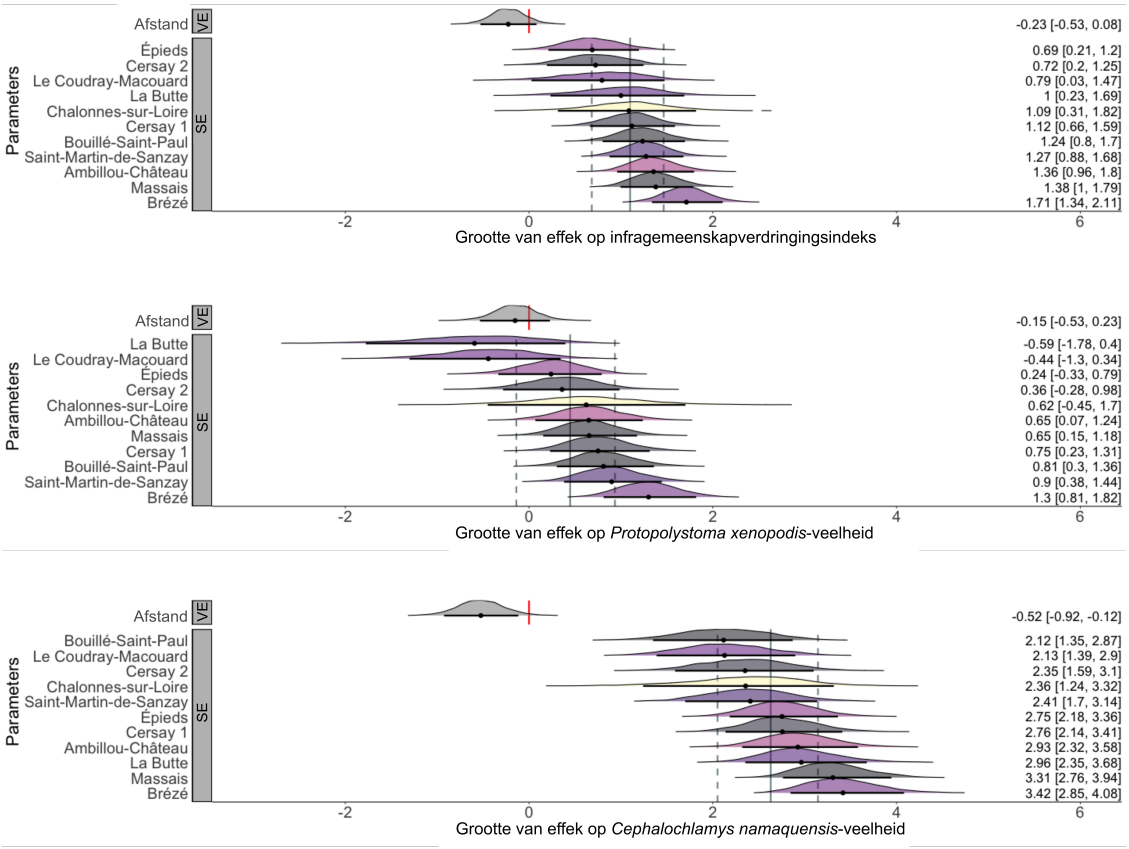
Modelterme	Rand-R^2	Voorwaardelike R^2
$ICr_{za} \sim SVL + SMI + (1\|ligging)$	0.8% ± 0.8 SF	30.5% ± 8.9 SF
$Ceph_{za} \sim SVL + SMI + (1\|ligging)$	1.2% ± 1.4 SF	48.4% ± 8.9 SF
$Prot_{za} \sim SVL + SMI + (1\|ligging)$	0.5% ± 0.5 SF	24.7% ± 10.5 SF
$ICr_{fr} \sim afstand + (1\|ligging)$	1.0% ± 1.2 SF	5.6% ± 2.9 SF
$Ceph_{fr} \sim afstand + (1\|ligging)$	0.9% ± 0.9 SF	4.4% ± 2.8 SF
$Prot_{fr} \sim afstand + (1\|ligging)$	1.1% ± 1.4 SF	13.7% ± 6.1 SF

infragemeenskapsverdringing of *C. namaquensis*-veelheid (Tabel 5.1).

Op die keper beskou het die Bayes-R^2 dit aan die lig gebring dat nóg die vaste effek van afstand vanaf invoerligging nóg die stogastiese effek van vindoord veel van die heterogeneïteit in parasitisme van *X. laevis* van westelike Frankryk verklaar (Tabel 5.1). Inspeksie van die vertrouensintervalle van die *a posteriori*-verdelings van die liggings het onthul dat die sekerheid in die beramings vir Chalonnes-sur-Loire, die ligging wat die verste van die invoerligging lê, oor al drie die GLMM'e die laagste is (Figure 5.3). Tewens, oor al drie GLMM'e heen was die ligging van La Coudray-Macouard die enigste wat keer op keer laer as verwagte vlakke van parasitisme vertoon het. Dit is ook die enigste vindoord waar die indringervarswaterkreef *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) teenwoordig was (Jean Secondi, persoonlike kommunikasie).

5.4 Bespreking

Parasiete se reaksie op biologiese indringing is veelvlakkig (Dunn & Hatcher, 2015). In die huidige studie laat die dinamiese wisselwerking tussen gebieduitbreiding van die amfibiese gasheer *X. laevis* en sy metasoönparasiete wat beide in die natuurlike en vreemde gebiede te siene is, die ryk geskakeerde respons van gasheer-parasiet-sisteme tot aandverandering blyk. Bowendien laat die gelyklopende ondersoek van gasheer-parasiet-dinamiek in beide die natuurlike en vreemde gebiede ons toe om prosesse wat in ruimte herhaal word, te eien.



Figuur 5.3: Opsommings van die beraamde *a posteriori*-verdelings van die vaste effekte (VE) van afstand van geringste koste vanaf die invoerligging en die stogastiese effek van vindoord van die drie Bayes-veralgemeende lineêre gemengde modelle met maatstawwe van parasitisme van *Xenopus laevis* in westelike Frankryk as respons. Swart kolletjies dui *a posteriori*-gemiddelde en stawe dui 89% vertrouensintervalle (CI) aan, waarvan die waardes aan die regterkant van elke verdeling aangetoon word. 'n Positiewe effekgrootte (aan die regterkant van die rooi lyn) vir 'n vaste effek dui 'n toename in potensiaal tot parasitisme in verhouding met daardie vaste effek aan. In die geval van die stogastiese effek, dui 'n positiewe afwyking van die gemiddelde effekgrootte (soliede grys lyn) met 89% VI (onderbroke grys lyn) bo-gemiddelde potensiaal vir parasitisme by daardie spesifieke ligging aan. Breedte van die 89% VI verteenwoordig vertroue in die beramings. Vindoorde is volgens afstand ingekleur, waar die ligste kleur die lokaliteit wat die verste van die invoerligging geleë is, aandui, en is vernoem na die naaste dorp.

5.4.1 Gasheerliggaamsgrootte het ietwat van 'n invloed op verdringing en lintwurmveelheid, maar nie monogeneërveelheid nie, by inheemse *Xenopus laevis*

Liggaamsgrootte van die gasheer is voorheen aangewys as 'n min-of-meer herhalende bepaler van parasietdinamiek in baie gasheertaksa (Kamiya *et al.*, 2014). Dit kan gesê word van 'n hele aantal paddaspesies, waar parasietgemeenskappe meer divers of parasietspesies hoër getalle bereik in groter, dus ouer, paddas (sien Bolek & Coggins, 2001; Campião *et al.*, 2015; Hamann *et al.*, 2006). In ons analise van inheemse *X. laevis* het ons 'n positiewe korrelasie tussen gasheerliggaamsgrootte en sekere maatstawwe van

parasitisme gemerk. Daar is 'n styging in verdringing in parasietinfragemeenskappe en die veelheid van een van die dominante infragemeenskapslede, die lintwurm *C. namaquensis*, in verhouding tot liggaamsgrootte, 'n tendens wat nie in die talryke monogeneërparasiet *P. xenopodis* opgemerk word nie.

Veelbetekenend is die invloed van gasheergrootte moontlik direk aan gasheerdieet gekoppel deur beide dieetverskeidenheid en die aantal prooiitems wat ingeneem word (Poulin & Morand, 2004). Dit is doodeenvoudig die geval omdat groter gashere meer sal eet, waardeur hulle hul kanse om trofies oordraagbare parasiete teë te kom, verhoog (Leung & Koprivnikar, 2019). Dit verduidelik moontlik waarom die verband juis tussen gasheerligaaamsgrootte en die veelheid van die lintwurm, 'n heteroksene parasiet wat sy weg deur middel van invertebraatprooi tot in die gasheer vind (Thurston, 1967), meer opvallend is as die verband tussen gasheerliggaamsgrootte en die veelheid van die monogeneër, 'n parasiet wat die gasheer deur middel van 'n vryswemmende larfstadium bereik (Theunissen *et al.*, 2014).

Andersyds mag verworwe immuniteit teen parasietinfeksies die invloed van parasietopgaring met ouderdom, waarvan liggaamsgrootte 'n aanduider is, teenwerk. Verworwe immuniteit in *X. laevis* teen sekondêre infeksies met *P. xenopodis* is al voorheen uitgewys (Jackson & Tinsley, 2001b), hoewel nie vir *C. namaquensis* nie. Met ander woorde, die verband tussen gasheerliggaamsgrootte, immuniteit en parasietlewensgeskiedenis behoort verder in die betrokke gasheer-parasiet-sisteem ondersoek te word.

'n Gedeelte van die variasie in liggaamsgrootte in die huidige datastel kan aan die waargenome beduidende geslagtelike tweevormigheid in liggaamsgrootte van *X. laevis* toegeskryf word. Al het ons nie uitdruklik vir die invloed van geslag op parasietverdringing of -veelheid getoets nie, gee die beduidende verskil in grootte te kenne dat wyfies van *X. laevis* moontlik meer verdronge parasietgemeenskappe met meer *C. namaquensis* kan huisves as mannetjies. Verskille in parasietinfeksies tussen mannetjies en wyfies, as dit wel bestaan, kan dus grotendeels aan die invloed van liggaamsgrootte, eerder as aan verskille in gasheergedrag of immuunreaksie wat die kanse op infeksie kan beïvloed, toegeskryf word. Eiesoortige infeksies van die geslagte van 'n Noord-Amerikaanse paddaspesie is vir sommige, maar nie vir alle nie, parasietspesies gevind (Bolek & Coggins, 2001). Mannetjies het meer van sekere parasiete gehuisves weens die langer tyd wat in akwatiese habitatte tydens die broeiseisoen spandeer word in vergelyking met die wyfies (Bolek & Coggins, 2001). Hierteenoor is wyfies meer geneig om met terrestriële parasiete geïnfekteer te word weens ekologiese verskille in habitatvoorkeure deur die jaar (Bolek & Coggins, 2001). In die reël is dit 'n meer opvallende tendens in soogdiere waar verskille in sosiale organisasie tussen mannetjies en wyfies meer algemeen is as in amfibieë (sien Bertolino *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2017; Stuart *et al.*, 2020).

'n Intrinsieke faktor wat nie in die huidige analise ingesluit is nie, is gasheerdigtheid.

In ’n analoë geval is daar ’n verband tussen gasheerdigtheid en die teenwoordigheid van protosoönparasiete in rooi eekhorings gevind (Bertolino *et al.*, 2003). Net so is die verbasend lae parasietvoorkomsyfer en -verskeidenheid van die parasietgemeenskappe van ’n molg verklaar deur die feit dat hierdie gasheer teen natuurlike lae digthede vir lang tye van die jaar voorkom (Comas & Ribas, 2013). In die geheel sien ons dat die bevolkingsdigtheid van vis-, voël- en soogdiergashere byna deur die bank ’n goeie bepaler van parasietspesierykheid by enige geografiese skaal is (Kamiya *et al.*, 2014).

Hoe dit ook al sy, die bewese invloed van gasheerfaktore op beide parasietinfragemeenskapverdringing en individuele spesieveelheid word heeltemal oorskadu deur die grootheid van die veranderlikheid in parasitisme wat deur liggingsverskille verklaar word. Met ander woorde, in *X. laevis* se natuurlike gebied verklaar die gasheereienskappe van liggaamstoestand en -grootte bloedweinig van die waargenome variasie in die verspreiding van metasoönparasiete tussen gashere.

5.4.2 Ekstrinsieke faktore speel die grootste rol in die vorming van parasitisme van inheemse *Xenopus laevis*

Die grootste gedeelte van die variansie in die metasoönparasietdinamiek van *X. laevis* in sy natuurlike gebied hou verband met die variasie tussen die Suid-Afrikaanse vindoorde, wat ’n kontinue reeks van versamelseisoene, monsternemingsjare en habitattipes voorstel. Nietemin is dit veral die veronderstelde verskille in habitatversteuring, wat wissel van omstedelike of onbegroeide mensgemaakte waterliggame tot ongerepte akwatiese sisteme, wat die vindoorde van mekaar onderskei. Terselfdertyd is plaaslikwerkende biotiese en abiotiese faktore, gevorm deur grondgebruik, die hoofdryfveer van die verskille wat tussen parasietgemeenskappe van ander paddaspesies waargeneem word (Campião *et al.*, 2012; Hartson *et al.*, 2011).

Nietemin wys ons analises dat die algehele rigting van die invloed van habitattipe en versteuringsvlakke nie eenvormig is nie. Regoor al drie analises in die natuurlike gebied het gashere wat in onbegroeide mensgemaakte gebiede (wat die mees mensversteurde vindoorde in ons datastel voorstel) versamel is, die mees geaggregeerde en veranderlike parasietinfragemeenskappe gehuisves. Dit kan van die breë vertrouensintervalle vir hierdie stogastiese effekgroottes afgelei word, wat ’n voorstelling van die meer ekstreme uitkomste van parasitisme in gashere van hierdie versteurde waterliggame is. Hiér sien ons heeltemal onverdronge parasietgemeenskappe waar die twee dominante parasiete dikwels afwesig is of hoogs verdronge parasietgemeenskappe met hoë maksimumparasietladings.

Vandaar blyk dit dat habitatversteuring verskeie en dikwels teenstrydige invloede op parasitisme het. Paddabevolkings van gewysigde landskappe mag wel laer gemiddelde infeksies ervaar en terselfdertyd groter variansie in infeksievlakke vertoon, gekoppel met

hoër maksimuminfeksies (Hartson *et al.*, 2011). Soortgelyk aan ons studie het vorige ondersoeke van die parasietgemeenskappe van amfibieë aangetoon dat intensiewe vorme van menslike grondgebruik, soos landbouontwikkeling, juis variasie in parasietinfeksie kan aanwakker – van die afwesigheid van parasiete tot episoötiese infeksies (Hartson *et al.*, 2011). Chemikalieë in landbouafloopwater en ander besoedelstowwe mag as immuunonderdrukkers in Amphibia optree, wat op hul beurt weer parasiete 'n hupstoot kan gee (Christin *et al.*, 2003; Pochini & Hoverman, 2017; Rohr *et al.*, 2008).

In skerp teenstelling hiermee is die parasiete van sekere paddaspesies baie sensitief vir die kombinasie van intensiewe landbou en plaagdoders en reageer dus op omgewingsversteuring met verlaagde rykheid en verskeidenheid (King *et al.*, 2007, 2010). Boonop lei die verlaagde habitatkompleksiteit van intens versteurde liggings na 'n verlaging in die beskikbaarheid van invertebraat-, voël- en soogdiergashere, wat weer die voltooiing van parasietlewensiklusse sal stuit (King *et al.*, 2007). Dit skep 'n verwagting van verhoogde parasitisme by meer ongerepte liggings, soos al voorheen veronderstel is vir die metasoönparasiete van *X. laevis* (Mbokane *et al.*, 2020; Svitin *et al.*, 2018). Nogtans vertoon die parasietgemeenskappe van gashere van ongerepte liggings nie konsekwent meer verdronge as dié van versteurde liggings in ons studie nie. Dit stel voor dat habitatversteuring nie die enigste rolspeler is nie.

As ons die uitgesproke liggingspeilvariansie in die veelheid van *C. namaquensis* in ag neem, kom daar iets van 'n ander prentjie na vore. Gashere van die mees ongerepte liggings het 'n hoër kans om met hierdie heteroksene parasiete geïnfekteer te word. Hieruit volg dat die opponerende effekte van die dryfvere van verandering, soos eutrofikasie, plaagdoders en algehele veranderinge in waterkwaliteit, vererger word as invertebraatintermediêre stadia betrokke is (Hartson *et al.*, 2011). Die veelheid van tussengashere kan toeneem in besoedelde water in reaksie tot beide 'n toename in voedselbronne en 'n afname in roofdierveelheid (Rumschlag *et al.*, 2019). Op hul beurt kan die teenwoordigheid en identiteit van tussengashere 'n merkbare invloed op die parasietgemeenskapsamestelling van die amfibieërgasheer uitoefen (Mihaljevic *et al.*, 2017). Dit was ook die bevinding van 'n vergelyking tussen twee bevolkings van 'n Suid-Amerikaanse paddaspesie wat by verskillende vlakke van habitatversteuring voorgekom het (Aguiar *et al.*, 2015). Paddas van die meer versteurde area het hoër parasietrykheid getoon, maar het minder spesies gehuisves wat van invertebrate as tussengashere gebruik gemaak het (Aguiar *et al.*, 2015).

Hierteenoor het 'n ander studie gewys dat paddas in versteurde vleilande eintlik hoër vlakke van parasiete met direkte lewensiklusse geakkommodeer het (King *et al.*, 2010). Parasiete met direkte lewensiklusse is gewoonlik die minste geaffekteer deur sulke omgewingsveranderinge (King *et al.*, 2010), wat verklaar hoekom die veelheid van *P. xenopodis* nie noodwendig hoër in meer natuurlike waterliggame is nie. Nogtans, is die parasiet nie in die algemeen meer talryk by hierdie liggings nie, ten spyte van groter veranderlikheid in

die veelheid van *P. xenopodis* tussen gashere van meer versteurde habitatte.

Vanuit die perspektief van die huidige en geskiedkundige plaaslike verplasing van *X. laevis* in sy natuurlike gebied van Suid-Afrika (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2016; Measey *et al.*, 2017; van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007) moet ons in gedagte hou dat die habitatte in ons datastel meer as net waterliggame op 'n versteuringsgradiënt is. Vorige studies het gewys dat *X. laevis* geredelik oorlands beweeg op soek na nuwe waterliggame (Measey, 2016) en dat dit ook wyd en syd rondgeskuif word vir die bevoorrading van damme vir hengelary en ander doeleindes (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Onbegroeide mensgemaakte en tydelike waterliggaame sal natuurlik meer vatbaar wees vir kolonisasie deur pioniers en sal dus moontlik *X. laevis* bevat wat onlangs vanaf ander habitatte uitgebrei het. Met ander woorde, die netto invloed van habitatversteuring op parasietdinamiek moet verder in die lig van die wydverspreide en gereelde uitbreiding van *X. laevis* in sy natuurlike gebied beskou word. Hierdie eienskap van die padda maak dat sommige van sy natuurlike bevolkings nie veel anders optree as sy vinnig uitbreidende bevolkings in die vreemde gebied nie.

5.4.3 Lintwurmveelheid neem af met afstand vanaf die invoerligging in uitheemse *Xenopus laevis*

Die aktief uitbreidende bevolking van *X. laevis* in sy vreemde gebied in westelike Frankryk vertoon opvallend minder tussen-ligging-variasie in parasitisme as in die natuurlike gebied. Natuurlik kan ons dit verwag van parasietinfragemeenskappe wat almal binne een seisoen van baie soortgelyke habitatte versamel is. Bowendien, ten spyte van waargenome verskille tussen die liggings in terme van gasheerdemografie, weet ons nou van ons analises van die natuurlike gebied dat hierdie verskille 'n geringe invloed op algehele veranderlikheid in parasitisme het. Die liggingspeilvariansie was die mees uitgesproke vir die veelheid van *P. xenopodis* wat deur sekere liggings met algehele lae gemiddelde veelheid van *P. xenopodis* en hoë veranderlikheid gekenmerk word, net soos ons vir die versteurde liggings in die natuurlike gebied gevind het.

Aanmerklik is dat die ligging wat die verste van die invoerpunt verwyderd is, telkemale *X. laevis* gelewer het met die mees veranderlike parasietinfragemeenskappe en lintwurm- en monogeneërveelhede. Analoog aan die versteurde liggings in die natuurlike gebied is so 'n patroon dikwels die sinjaal van 'n onlangs versteurde, pionier gasheer-parasiet-versameling, wat te wagte is van die ligging wat die verste van die invoerpunt geleë is. Voorts identifiseer die saamlopende ondersoek van hierdie tendens in die natuurlike en vreemde gebied die uitheemse gasheer-parasiet-sisteem se uitstaande kenmerk nie bloot as 'n verarmde parasietgemeenskap nie (Schoeman *et al.*, 2019; Torchin *et al.*, 2003), maar eerder as 'n meer veranderlike en dus onvoorspelbare parasietdinamiek.

Ons het rede om te glo dat die veelheid van die lintwurm, maar nie die ander twee ondersoekte maatstawwe van parasitisme nie, mag afneem na gelang van afstand vanaf die invoerpunt in die uitbreidende bevolking van *X. laevis* in westelike Frankryk. Die verskynsel van verlaagde parasitisme (verlaagde veelheid, voorkomsyfer en verskeidenheid) by die gebiedsrand van 'n uitbreidende indringerbevolking is ook by uitheemse voëls (Coon & Martin, 2014), klein soogdiere (Stuart *et al.*, 2020) en reptiele (Barnett *et al.*, 2018; Coates *et al.*, 2017) gevind. Daarbenewens is dit ook grondig in die indringerbevolking van die reuse skurwepadda in Australië ondersoek (sien Brown *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2021; Phillips *et al.*, 2010).

Bevolkingsdigtheid is die mees waarskynlike verklaring vir hierdie effek, aangesien die digtheid van *X. laevis* laag is aan die rand van die gebied van die indringerbevolking in westelike Frankryk (Vimercati *et al.*, 2020). Lae bevolkingsdigtheid in paddas is met verlaagde oordragkoerse van parasiete by die gebiedsrand in verband gebring, alhoewel opeenvolgende stigtingseffekte ook 'n uitwerking kan hê (Cronin & Reeve, 2005; Kelehear *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2010).

Tegelykertyd mag die effek van gebiedsuitbreiding eintlik deur die effek van gasheerliggaamsgrootte verstrengel word. Afstand vanaf die invoerpunt en gasheerliggaamsgrootte korreleer in die huidige datastel, wat nie verrassend in die lig van die ruimtelike sortering van uitbreidingseienskappe in hierdie gasheerbevolking is nie (Courant *et al.*, 2019b). Ons analises van die inheemse parasietversamelings het uitgewys dat beide die verdringing in die parasietinfragemeenskappe en die veelheid van *C. namaquensis* saam met liggaamsgrootte toeneem. Die afname in liggaamsgrootte na die rand van die gebied wys die vinger na die meganisme agter die waargenome afname in parasietveelheid. Dit boei dat die koppeling van die ruimtelike sortering van die twee kenmerke – dié van verbeterde liggaamsgrootte vir uitbreiding en verlaagde parasietladings – indringersukses selfs verder kan aanblaas. Hier moet ons in gedagte hou dat verlies aan parasiete gedurende indringing byna onvermydelik is (Torchin *et al.*, 2003), maar dat die rol daarvan as dryfveer van indringersukses aanvegbaar is (Blackburn & Ewen, 2017). Byvoorbeeld, die vrystelling vanaf parasitiese helminte in indringerpaddas dra nie beduidend tot indringervermoë by nie (Roznik *et al.*, 2020). Overgesetsynde mag die effense afname in sestoodlading dalk die gasheer 'n hupstoot tydens gebiedsuitbreiding gee, maar dis heelwat meer waarskynlik dat dit bloot 'n oorblyfsel van die ruimtelike sortering van uitbreidingskenmerke bo groot liggaamsgrootte is.

Laastens mag die gesamentlike verskyning van die indringervarswaterkreef *P. clarkii* by een van die liggings tot verskille in parasitisme tussen hierdie ligging en ander in die vreemde gebied bydra. Oor al drie analises wat op die datastel van die uitheemse gashere uitgevoer is, het hierdie betrokke *X. laevis* konsekwent laer as verwagte verdringing van hulle parasietgemeenskappe getoon, asook laer as verwagte lintwurm- en monogeneërveelhede. Waar hierdie twee spesies in westelike Frankryk saam voorkom, is

P. clarkii 'n moontlike roofdier van *X. laevis* (Kruger *et al.*, 2019). Sy teenwoordigheid mag dus die getal *X. laevis* beperk en só sy algehele bevolkingsdigtheid by hierdie ligging verlaag, soos gevind is vir *P. clarkii* en ander Amphibia elders (Cruz *et al.*, 2006; Souty-Grosset *et al.*, 2016). Soos reeds genoem kan verlaagde gasheerdigthede parasietgetalle afwaarts beïnvloed (Bertolino *et al.*, 2003; Comas & Ribas, 2013; Kamiya *et al.*, 2014). Dit dui op die invloed van stogastiese effekte op parasietinfeksies van *X. laevis* in westelike Frankryk wat eie aan liggings is.

5.4.4 Implikasies vir die plaaslike en wêreldwye indringing van gasheer-parasiet-sisteme

In 'n wêreld wat aan die verander is as gevolg van die grootskaalse beweging van organismes, is dit van kardinale belang om nie net die parasietdinamiek van gebiedsuitbreiding te beskryf nie, maar ook om voorspellings oor die toekomstige verspreiding van spesies en hulle simbionte te kan maak. Ons studie het die oopvlekking van parasiete se algemene reaksies tot gebiedsuitbreiding tesame met 'n wêreldwye indringeramfibie voor oë gehad deur die faktore wat die samestelling van sy parasietgemeenskappe in beide sy natuurlike en vreemde gebiede te ondersoek.

Ons sien dat mensgemaakte versteuring en gasheerverplasing terselfdertyd positiewe en negatiewe invloede op parasietoordrag kan hê. Duidelik is die konsep van spesieryke inheemse parasietgemeenskappe teenoor verarmde uitheemse parasietgemeenskappe (Schoeman *et al.*, 2019; Torchin *et al.*, 2003) 'n oorvereenvoudiging van die ware toedrag van sake. Gasheerbevolkings wat onlangs gevestig is, dra nie noodwendig minder parasiete of fasiliteer minder interaksies in hulle parasietinfragemeenskappe nie. Hierdie versamelings word eerder uitgeken aan hulle veranderlikheid, wat in wese die perfekte storm vir parasietuitbrake is wat hierdie nuut gevestigde bevolkings op hulle knieë kan dwing, soos wat al voorheen vir *X. laevis* in aanhouding opgeteken is (Brayton, 1992; Cohen *et al.*, 1984; Elkan & Murray, 1952; Nigrelli & Maraventano, 1944).

Die telkens teenstrydige response van die twee dominante parasietspesies tot die bepalers beklemtoon die belang van studies wat parasietdinamiek op 'n spesie-tot-spesie-basis ondersoek, teenoor die samepoeling van parasietspesies (Poulin, 2019). Ons onvolledige verstaan van hierdie wisselende dinamiek belig ook die nut van elegante en noukeurige natuurhistoriese eksperimente wat indringerekoloë met 'n beter begrip van die koïngevoerde parasiete wat hulle teëkom, kan laat (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2021). Jare se studie nieteenstaande (oorsig in Tinsley, 1996) is daar nog baie geheime in die parasietversamelings van *X. laevis* vasgevang, met onbeantwoorde vrae oor gasheerimmuunrespons, parasietlewensiklusse, veral betreffende die gashere buiten *X. laevis*, en selfs basiese taksonomie wat voorop staan.

'n Beter begrip van die parasietekologie van 'n wydverspreide amfibie soos *X. laevis* sal heelwat toepassings hê. Met 'n welbeskryfde, wydverspreide model-gasheer-parasietsisteem tot ons beskikking kan indringerbioloë *X. laevis* en sy parasiete as bio-aanduiders van versteuring benut. Aangesien *X. laevis* 'n parasietversameling huisves wat ook van invertebrate, reptiele, visse en voëls as gashere in hulle lewensiklusse gebruik maak (Schoeman *et al.*, 2020), is die afname of afwesigheid van sekere parasietspesies 'n nuttiger aanduider van ekosisteemgesondheid as die amfibieërspesies op sigself. Uiteindelik sal 'n grondige begrip van die onmiskenbare parasietversameling van 'n onlangs gevestigde gasheerbevolking 'n nuttige hulpmiddel wees om die wasdom van indringerbevolkings se vestiging in ekosisteme te bepaal. Verder sal dit ons bystaan om beter voorspellings te maak oor die impakte van komplekse, multispesie-indringerpakkette in 'n immer veranderende wêreld.



Hoofstuk 6

’n Vergete invoering ontbloot ’n verborge ene: kofilogeografie van die gewone platanna en sy monogeneërparasiet werp nuwe lig op hulle gedeelde invoergeskiedenis

6.1 Inleiding

Die Antroposeen word deur die ongeëwenaarde mensbemiddelde beweging van organismes vanaf hulle natuurlike gebiede tot in ekosisteme regoor die wêreld gekarakteriseer (Capinha *et al.*, 2015; Ricciardi, 2007). Hierdie rondskommeling van die wêreld se biota is ’n besliste dryfveer van aardverandering, soos beaam deur die feit dat indringerspesies ’n derde van onlangse uitsterwings van diere meegebring het (Blackburn *et al.*, 2019). In hierdie opsig was die ontwikkeling van metodes om beide die oorsprong en uitbreiding van biologiese indringers na te speur, nog nooit belangriker gewees nie.

Uitheemse organismes word as *indringers* beskou as hulle dit regkry om vanaf hulle aanvanklike invoerpunt te versprei en nuwe bevolkings in die vreemde gebied te vestig (Blackburn *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2011b). Daarbenewens kan organismes beide inheems en uitheems binne die grense van hulle land van oorsprong wees, veral in groot lande met hoë klimaats- en habitatsverskeidenheid (van Wilgen *et al.*, 2020). Hierdie sogenoemde *plaaslike eksote* kom buite hulle natuurlike gebied voor, tog bly hulle binne

die landsgrense, wat hulle opsporing en bestuur strem (Guo & Ricklefs, 2010). Analoog hieraan is wat bekend staan as *intraspesifieke kriptiese indringers*. Dit verduidelik die proses waartydens een stamlyn van ’n spesie versprei na dele van die spesie se natuurlike gebied waar ’n ander stamlyn reeds teenwoordig is, dikwels met menslike hulp (Morais & Reichard, 2018).

Die gewone platanna *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae) is stellig een van die wêreld se mees wydverspreide en welbestudeerde amfibieë (Measey *et al.*, 2012; van Sittert & Measey, 2016). Soos wat grootskaalse uitvoere van *X. laevis* vanaf Suid-Afrika hierdie padda na laboratoriums op alle kontinente behalwe Antarktika geneem het, het verdere toevallige en opsetlike vrystellings tot sy invoering en indringing na areas buite sy natuurlike suidelike Afrika gelei (Measey *et al.*, 2012).

Die vermoë om die natuurlike oorsprong van die indringerbevolkings van *X. laevis* na te speur word teweeggebring deur die hoë vlakke van filogeografiese strukturering van hierdie padda is sy natuurlike gebied van suidelike Afrika (de Busschere *et al.*, 2016; Furman *et al.*, 2015). Vorige studies oor die morfologie en genetika van *X. laevis* het uiteenlopende bevolkings in Suid-Afrika uitgeken wat deur groot bergreekse en verskillende klimaatstreke afgesonder word (de Busschere *et al.*, 2016; du Preez *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2015; Measey & Channing, 2003). Omgekeerd het die padda se indringerbevolkings merkbaar laer genetiese diversiteit getoon en bestaan byna uitsluitlik uit individue met ’n genetiese samestelling wat verwant is aan die inheemse bevolkings van *X. laevis* van die winterreënvalstreek in die suidweste van Suid-Afrika (de Busschere *et al.*, 2016; Lillo *et al.*, 2013; Lobos *et al.*, 2014).

Die gedrag en genetika van *X. laevis* van die natuurlike gebied van die suidwestelike stamlyne het die bestaan van beide natuurlike en mensbemiddelde verplasing in die streek voorgestel, wat sekere ondersoekers die idee dat die padda as ’n plaaslike eksoot gesien moet word, laat voorstaan het (Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017). Daarby strek die verplasing van stamlyne van *X. laevis* moontlik selfs verder as die suidwestelike winterreënvalstreek, op grond van die feit dat die oorgrote meerderheid van die uitvoere gerig was op die plaaslike mark, insluitend heelwat navorsings- en hoër onderriginstellings in die natuurlike gebied van die noordwestelike stamlyn (van Sittert & Measey, 2016). Nietemin is die kriptiese indringing van *X. laevis* van die suidwestelike stamlyne na die natuurlike gebied van die noordoostelike stamlyn nog nie in vorige filogeografiese studies van hierdie padda bevestig nie (de Busschere *et al.*, 2016; du Preez *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2015; Measey & Channing, 2003).

Die filogeografiese analises van indringerspesies kan insig bied om sodoende indringergeskiedenisse saam te stel, potensiële gebiedsuitbreiding en indringersukses te voorspel en beheerstrategieë te ontwikkel (bv de Busschere *et al.*, 2016; Dufresnes *et al.*, 2017; Dlugosch & Parker, 2008; Hiller & Lessios, 2017; Lee & Gelembiuk, 2008; Prentis *et al.*,

2009; Stouthamer *et al.*, 2017; Zahiri *et al.*, 2019). Desnieteenstaande, in die meeste gevalle het die beskikbare molekulêre data nie opsigself die nodige resolusie om die beweging van spesies te volg nie (bv Ahyong *et al.*, 2017; Criscione *et al.*, 2006). Om die waarheid te sê, die gebruik van molekulêre bevolkingsgenetika teen die kort tydskale en growwe genomiese resolusie van die meeste biologiese indringings is slegs in rare gevalle van nut (Fitzpatrick *et al.*, 2012).

'n Meer holistiese benadering om die oorsprong en gebiedsverandering van indringerspesies te bepaal kan molekulêre inligting vanaf koïngevoerde parasiete betrek. 'n Geïntegreerde benadering soos dié is al voorgestel om indringers wat moeilik naspeurbaar is, te volg, maar word selde toegepas (Clavero *et al.*, 2016). Ter voorbeeld, die lang debat oor die kriptogeniese geskiedenis van die Europese alikreukel is met behulp van 'n geassosieerde digeneërparasiet opgelos (Blakeslee *et al.*, 2008). Op dieselfde manier het die intraspesfieke variasie in die morfologie van monogeneërparasiete beide die oorsprong en die ingevoerde lewenstadium van 'n indringersardien in Afrika opgelos (Kmentová *et al.*, 2019), lig gewerp op die geskiedenis van 'n indringerbevolking van seegrondelvisse in Europa (Ondračková *et al.*, 2012) en inligting oor die invoerroete van 'n indringerdikkop in Europa verskaf (Huyse *et al.*, 2015).

Gewoonlik openbaar monogeneërparasiete genoegsame vlakke van filogeografiese strukturering by die bevolkingspeil om intraspesifieke ruimtelike patrone in hulle gashere te assesseer (Baldwin *et al.*, 2012; Hahn *et al.*, 2015; Huyse *et al.*, 2017; Kmentová *et al.*, 2018, 2020). Op die allerminste kan die filogeografiese strukturering van monogeneërstamlyne bewyse wat deur die gasheerdatastel of geskiedkundige optekeninge bekendgemaak word, steun. Die welopgetekende antropogeniese invoering van salmoniedvisstapels regoor Europa word byvoorbeeld ook in die filogeografie van hulle girodaktiliedmonogeërs se stamlyne weergegee (Hahn *et al.*, 2015). In die besonder word monogeneërparasiete as goeie merkers gesien omdat hulle kort generasies, direkte lewensiklusse en gewoonlike hoë gasheerspesifisiteit het (Nieberding & Olivieri, 2007).

Ergo, ons stel voor dat die blaaspolistomatied *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) die ideale hulpmiddel is om die kontak tussen die verskillende stamlyne van sy gasheer *X. laevis* regoor sy natuurlike gebied in suidelike Afrika, wat tot dusver onbevestig was, na te speur. In natuurlike bevolkings regoor Suid-Afrika is *P. xenopodis*, die mees wydverspreide van die spesies van *Protopolystoma*, beperk tot 'n enkele gasheerspesiekomplek, *X. laevis sensu lato*, selfs as dit simpatries met ander spesies van *Xenopus* voorkom (Tinsley & Jackson, 1998a,b). Patrone van gasheerspesifisiteit en spesiëring in *Protopolystoma* stem met die filogenetiese verwantskappe tussen hulle gashere ooreen, wat sinspeel op 'n nabye koëvolusionêre verbintenis (Tinsley & Jackson, 1998a). Daarbenewens bestaan daar merkbare morfologiese variasie tussen bevolkings van *P. xenopodis* regoor suidelike Afrika en daardie van die meer noordelike gasheersubspesies (Tinsley & Jackson, 1998b). Soortgelyke variasie is te

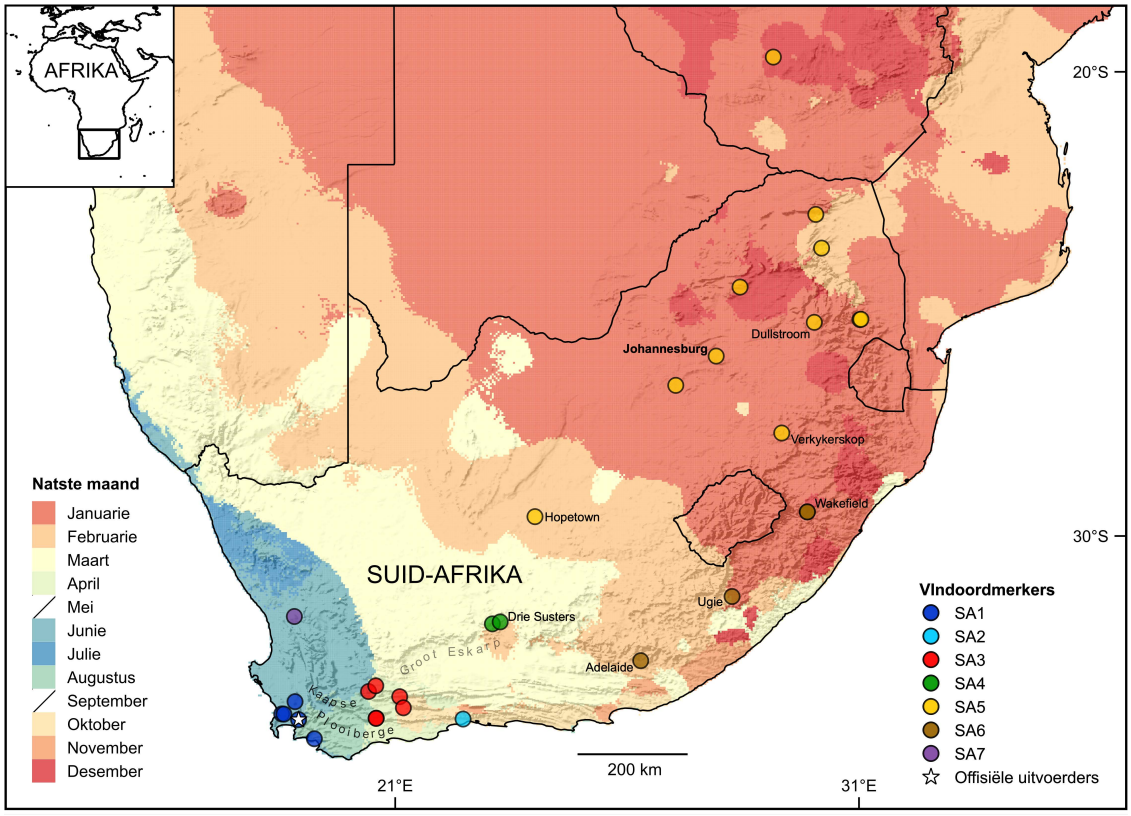
siene tussen die polistomatiese van *X. laevis* van die suidwestelike en noordoostelike stamlyne binne Suid-Afrika (sien Bylaag B vir die analise). Hierdie faktore dui daarop dat die filogenie van *P. xenopodis* 'n spieëlbeeld kan wees van dié van *X. laevis*, ook op die intraspesifieke vlak, wat beteken dat hierdie gasheer-parasiet-sisteem 'n goeie kandidaat is vir 'n kofilogeografiese studie.

Alles inaggenome kan die welbestudeerde, wydverspreide en intiem geassosieerde *X. laevis* en *P. xenopodis* sisteem as 'n konsepbewys dien dat intraspesifieke parasietfilogeografie die kriptiese indringings van gasheerstamlyne kan ontbloot. In die huidige studie het ons die toepasbaarheid van hierdie geïntegreerde benadering getoets met betrekking tot die opsporing van intraspesifieke kriptiese indringings. Hiermee wou ons vasstel of die filogeografie van *P. xenopodis* in sy natuurlike gebied (1) die aangetekende intraspesifieke divergering van sy gasheer weerspieël en (2) onlangse mensbemiddelde kontak tussen uiteenlopende stamlyne van *X. laevis* kan blootlê.

6.2 Metodes

6.2.1 Gasheer- en parasietmonsterneming

Gedurende 'n parasietopname van *X. laevis* wat van 2017 tot 2019 uitgevoer is, is daar 'n totaal van 59 volwasse *X. laevis* en hulle ooreenstemmende 59 *P. xenopodis*-parasiete in suidelike Afrika, Frankryk en Portugal versamel (sien Bylaag A vir breedvoerige inligting). In die natuurlike gebied van suidelike Afrika is 46 volwasse paddas, wat tussen Maart 2017 tot April 2019 in lewergeaasde tregterfuike vanaf 30 liggings in die streek gevang is, ondersoek (Figuur 6.1). Hierdie vindoorde is op grond van die geografiese verspreiding van die filogeografiese stamlyne van *X. laevis* in Suid-Afrika, voorgestel deur de Busschere *et al.* (2016), gekies. Hierdie stamlyne is benoem as SA1–3 en SA7 in die winterreënvalstreek na die suidweste en SA4–6 in die somerreënvalstreek na die noordooste (Figuur 6.1). Dienooreenkomstig is die *X. laevis* wat kuslangs aan die suidweste van die Kaapse Plooiberge versamel is as SA1 getipeer, of SA2 as hierdie kustelike liggings meer na die ooste was. Die SA3 *X. laevis* is tussen die Kaapse Plooiberge naby Laingsburg tussen die suidwestelike kus en die Groot Eskarp aan die noordooste versamel, terwyl SA4 *X. laevis* meer noordwaarts in die laaglandse Karoo-halfwoestyn in die somerreënvalstreek naby die platorand van die Groot Eskarp versamel is. Die *X. laevis* wat aan die noordekant van die Kaapse Plooiberge naby aan die westelike kus in die wintereënvalstreek versamel is, is as SA7 beskou. Laastens, die *X. laevis* van die somerreënvalstreek na die noordooste is as SA5 geklassifiseer as hulle op die binnelandse plato van die Groot Eskarp versamel is, of as SA6 as hulle aan die rand van die Groot Eskarp naby aan die oostelike seesoom versamel is.



Figuur 6.1: Vindoorde in suidelike Afrika waar 46 volwasse *Xenopus laevis* saam met die platwurmparasiet *Protopolystoma xenopodis* versamel is. Vindoorde is volgens die geografiese omvang van die natuurlike filogeografiese stamlyne van *X. laevis* in die gebied (SA1–7), geklassifiseer, volgens (de Busschere *et al.*, 2016). Sleutellokaliteite is volgens die naaste dorp of stad (in geval van Johannesburg) benoem en Jonkershoek, die bronligging van die meerderheid van geskiedkundige uitvoere van *X. laevis*, is aangedui. Bergreekse word met gearseerde reliëf aangedui en reënvalseisoenaliteit word deur die natste maand van elke 25 km^2-koördinaatnetsel verteenwoordig, met somermaande (Oktober tot Maart) in skakerings van rooi en wintermaande (April tot Augustus) in skakerings van blou. Maandelikse gemiddelde neerslagdata, verkry vanaf die WorldClim 2.1-databasis teen 'n ruimtelike skerpte van arc-minute (Fick & Hijmans, 2017), is aangewend om die maande met die hoogste geskiedkundige gemiddelde neerslag van 1970 tot 2000 vir elke koördinaatnetsel te identifiseer. Hoogtedata is vanaf die Natural Earth-databasis bekom. Die kaart is in QGIS *weergawe* 3.10.2-A Coruña (QGIS Development Team, 2018) met die Mercator-projeksie saamgestel. Verwerking van die neerslaggemiddelde is in R *weergawe* 4.0.2 (R Core Team, 2020) uitgevoer.

In die vreemde gebied is 13 volwasse *X. laevis*, vanaf 12 liggings in westelike Frankryk en een ligging naby Lissabon, Portugal, gedurende die somers van 2017, 2018 en 2019, versamel. In Frankryk is die paddas in geaasde fuike deur lede van die EU LIFE CROAA-span versamel as deel van die plaaslike uitroeiingsprogram vir indringeramfibieë. Die volwasse padda van Portugal is vanuit die plaaslike versamelde laboratoriumvoorraad van die Universiteit van Lissabon geneem.

Vóór disseksie is alle paddas van kant gemaak deur verdowing in 6% etiel-3-aminobensoaat metaansulfonaat (MS222) (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) gevolg deur murgsteek. Dooie paddas is vir die teenwoordigheid van ekto- en endoparasiete ondersoek. In

Tabel 6.1: Voorvoorders wat vir die DNA-amplifikasie en -volgordebepaling van die *COX1*- en *rrnS*-gene van *Xenopus laevis* en *Protopolystoma xenopodis* aangewend is, met inligting oor teikengene, orientasie (voorwaarts [V] en tru [T]) en volgordes.

Teikengeen	Voorvoerder	Volgorde (5' tot 3')
X. laevis COX1	'LCO1490' [V] (Folmer *et al.*, 1994)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	'HCO2198' [T] (Folmer *et al.*, 1994)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
	'VF1' [F] (Ivanova *et al.*, 2006)	TTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG
	'VR1' [T] (Ward *et al.*, 2005)	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATC
P. xenopodis COX1	'L-CO1p' [F] (Littlewood *et al.*, 1997)	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT
	'H-Cox1p2' [T] (Littlewood *et al.*, 1997)	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG
	'H-Cox1R' [T] (Héritier *et al.*, 2015)	AACAACAAACCAAGAATCATG
X. laevis rrnS	'12SA-F' [V] (Kocher *et al.*, 1989)	CTGGGATTAGATACCCCACTA
	'12SB-R' [T] (Kocher *et al.*, 1989)	TGAGGAGGGTGACGGGCGGT
P. xenopodis rrnS	'12SpolF1' [V] (Héritier *et al.*, 2015)	YVGTGMCAGCMRYCGCGGYYA
	'12SpolR1' [T] (Héritier *et al.*, 2015)	TACCRTGTTACGACTTRHCTC
	'12SpolR9' [T] (Héritier *et al.*, 2015)	TCGAAGATGACGGGCGATGTG

totaal is 59 polistomatiede (een per gasheerindividu) uit die blaas verkry en ingesluit in die huidige studie. Parasiete en monsters van die lewerweefsel van die ooreenstemmende 59 paddagashere is in 70% etanol bewaar. Toepaslike institusionele, nasionale en internasionale riglyne vir die aanhouding en gebruik van diere is in ooreenstemming met die Noordwes-Universiteit se AnimCare-etieknommer NWU-0380-16-A5-01 gevolg.

6.2.2 Molekulêre dataversameling

Die gepreserveerde gasheer- en parasietweefsel het DNA-ekstraksie met óf die PCRBIO Rapid Extract PCR-stel (PCR Biosystems Bpk., Londen, Verenigde Koninkryk) óf die *Quick*-DNA™ Miniprep Plus-stel (Zymo Research, Verenigde State) ondergaan. Gevolglik is die amplifikasiereaksies met 2 tot 5 μL geëkstraheerde genomiese DNA, 1.25 μL voorwaarste voorvoerder, 1.25 μL truvoorvoerder, 12.5 μL hoofmengsel en PCR-graad-water tot die finale volume van 25 μL uitgevoer. Die hoofmengsels van PCR-reagense wat gebruik is, was óf die PCRBIO HS Taq Mix Red (PCR Biosystems Bpk., Londen, Verenigde Koninkryk) óf die OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs Bpk., Massachusetts, Verenigde State). Verskeie voorvoerderkombinasies is gebruik om die volgordes van die gedeeltelike *COX1* en *rrnS*-gene van die 59 padda-polistomatied-pare te bepaal (Tabel 6.1).

Die termosiklusseringsprofiel wat op elkeen van die amplifikasiereaksies uitgevoer is, het afgehang van die voorvoerderpaar en hoofmengsel wat gebruik is. Oor al die reaksies heen is die verlengingstemperatuur deur die hoofmengsel, soos deur die verskaffer aangedui, bepaal. Die 'LCO1490'/'HCO2198' en 'VF1'/'VR1'-voorvoerderpare is met die volgende algemene termosiklusseringsprofiel aangewend: aanvanklike denaturasie teen 95°C vir

2 min, gevolg deur 35 siklusse van denaturasie teen 95 °C vir 30 sek, hibridisering vir 30 sek teen 50 °C vir die eerste voorvoerderpaar en 54 °C vir die tweede en verlenging vir 2 min, afgesluit met een siklus van verlenging vir 7 min. In die geval van die '12SA-F'/'12SB-R' voorvoerderpaar is die voorgestelde termosiklusseringsprofiel van Amaro *et al.* (2013) gevolg. Vir die amplifikasie van die twee polistomatiedgene is die termosiklusseringsprofiel wat deur Héritier *et al.* (2015) aanbeveel is, vir alle voorvoerderpare aangewend.

Vir suiwering en volgordebepaling is alle PCR-produkte na 'n kommersiële laboratorium (Inqaba Biotec, Pretoria, Suid-Afrika) gestuur wat die ExoSAP-protokol (New England Biolabs Bpk., Massachusetts, Verenigde State) vir suiwering gebruik het en is die volgordes met BigDye® Terminator *version* 3.1 Cycle Sequencing, met behulp van die ooreenstemmende voorvoerderpaar wat in die PCR gebruik is, op 'n ABI3500XL-analiseerder bepaal. Volgordes is gemonteer en met die hand versorg in Geneious Prime *weergawe* 2021.0.3 (www.geneious.com).

6.2.3 Haplotiepnetwerk

Die intraspesifieke filogeografie van beide *X. laevis* en *P. xenopodis* is as haplotiepnetwerk geanaliseer. Elkeen van die vier stelle volgordes, naamlik die padda se *COX1* en *rrnS* en die polistomatied se *COX1* en *rrnS*-gene, is deur die Clustal Omega-algoritme (Sievers & Higgins, 2017), soos geimplementeer in Geneious Prime, belyn. Vir die proteïenkoderende gene is translasiebelyning aangewend onder die vertebraat mitochondriese genetiese kode (tabel 2) vir die paddas se *COX1* en die eginoderm en platwurm mitochondriese genetiese kode (tabel 9) vir die polistomatiede se *COX1*. Die onderskeie geenbelynings is tot die lengte van die kortste volgorde besnoei om gapings op die punt te verwyder, aangesien gapings in alle geval tydens die analise uitgeskakel word (Leigh & Bryant, 2015). Die belynde gene is per individu in Geneious Prime aaneengeskakel, wat een padda- en een polistomatiedbelyning tot gevolg gehad het. Minimumspannetwerke (MSN) van die aaneengeskakelde gedeeltelike *COX1* en *rrnS*-geendatastelle is vir 59 *X. laevis* en 59 *P. xenopodis*-individue in PopART *weergawe* 1.7.2 afgelei (Bandelt *et al.*, 1999; Leigh & Bryant, 2015).

6.2.4 Filogenetiese analises

Vir die filogenetiese analises is duplikaatvolgordes met behulp van die CD-HIT-program (Fu *et al.*, 2012; Li & Godzik, 2006), wat op die aanlynwebbediener (Huang *et al.*, 2010) uitgeoefen is, uitgeken. Gasheer- en parasieteksemplare met 'n unieke *COX1* of *rrnS*-geenhaplotipe is vir die analise behou. Die *COX1* en *rrnS*-geenvolgordes vir die kongeneriese geelpensplatanna *X. muelleri* (Peters, 1844) (toetredingsnommers EU599031 en AY581657; Evans *et al.*, 2004 en Evans *et al.*, 2008) en die polistomatied *P. occidentalis*

Tinsley *et* Jackson, 1998 (toetredingsnommers KR856179 en KR856121; Héritier *et al.*, 2015) is vanaf GenBank verkry en as buitegroepe toegevoeg. Hierdie polistomatied infekteer slegs *X. muelleri*-agtige spesies, selfs as dit simpatries met *X. laevis* voorkom (Tinsley & Jackson, 1998b). Daarby produseer sy gasheer *X. muelleri* blykbaar steriele nageslag wanneer hibridisasie tussen hierdie spesie en sy simpatriese kongeneer *X. laevis* plaasgevind het (Fischer *et al.*, 2000). Derhalwe is die gekose buitegroepe geskik vir 'n intraspesifieke analise van die *X. laevis* en *P. xenopodis* gasheer-parasietsisteem.

Die gevolglike datastelle is, ná die verwydering van duplikate en die toevoeging van buitegroepe, belyn op dieselfde wyse as vir die haplotiepnetwerke behalwe dat die belyning op die ou end nie besnoei is nie. Beskrywende statistiek van die twee belynings is in DnaSP *weergawe* 6.12.03 afgelei (Rozas *et al.*, 2017).

Aanvanklik het die aaneengeskakelde belynings uit vier opdelings bestaan, naamlik die drie kodonposisies van die gedeeltelike *COX1* en die *rrnS*-geen. Die ModelFinder-seleksieroetine (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), in samewerking met die FreeRate-heterogeneïteitsmodel (Soubrier *et al.*, 2012) en uitgevoer in IQ-TREE *weergawe* 2.1.2 (Minh *et al.*, 2020), is aangewend om die optimale model van molekulêre evolusie vir elke opdeling te vind. Om die optimale opdelingskema en die mees geskikte evolusionêre modelle vir elke belyning te vind, is die aanvanklike opdelings sekwensieel saamgesmelt (Chernomor *et al.*, 2016) totdat modelpassing, wat deur die Bayes-inligtingskriterium (BIC) geëvalueer is, nie meer verbeter het nie.

Hierna is die maksimum aanneemlikheidsfilogenie (ML) van die gasheer onder die TIM2-model (Posada, 2003) vir alle opdelings tesame met randontkoppelde FreeRate-heterogeneïteitsmodelle (Soubrier *et al.*, 2012), proporsies van invariante liggings (Gu *et al.*, 1995) en diskrete gamma-modelle (Yang, 1994) vir elke aanvanklike opdeling afgelei. Insgelyks is die ML-boom van die polistomatied onder die TPM3-model (Kimura, 1981) met 'n FreeRate-heterogeneïteitsmodel (Soubrier *et al.*, 2012) vir elkeen van die aanvanklike opdelings gesamentlik afgelei. Die analises is in IQ-TREE *weergawe* 2.1.2 (Minh *et al.*, 2020) uitgevoer, met die assessering van taksteun deur ultravinnige-skoenlussteekproefneming (UFboot2; Hoang *et al.*, 2018) en die Shimodaira-Hasegawa benaderde aanneemlikheidsverhoudingstoets (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010), elk met 10 000 herhalings.

Die gevolglike topologieë is met betrekking tot die die buitegroepe in TreeGraph2 *weergawe* 2.15.0-877 *beta* gewortel (Stöver & Müller, 2010). Klades met UFboot2-steun laer as 95% of SH-aLRT laer as 80% is op hulleself ingevou tot politomieë in dieselfde program.

6.2.5 Kofilogenetiese analises

Die resulterende filogenieë het die basis gevorm van ’n globale passingsbenadering tot die kofilogenetiese analises van *X. laevis* en *P. xenopodis*. Die globale kongruensie van die filogenieë van *X. laevis* en *P. xenopodis* is deur die implementering van beide die Procrustes-benadering tot Kofilogenie (PACo) (Balbuena *et al.*, 2013) en die vierdehoek statistiese benadering van ParaFit (Legendre *et al.*, 2002) geassesseer. PACo en ParaFit kan, as ’n stappie verder as ander globale passingsmetodes, ook koëvolusionêre afleidings op die vlak van spesiesinteraksies maak, wat lei tot ’n meer direkte afleiding van die proses (Balbuena *et al.*, 2013; Legendre *et al.*, 2002; Poisot & Stouffer, 2015). Vervolgens kan beide hierdie metodes bome aanvaar wat nie volledig opgelos is nie en verder ook onewe getalle van terminale vertakpunte van gashere en parasiete ondersteun, soos wat die geval was vir ons filigenieë.

In PACo het ons in die besonder die afhanklikheid van die parasietfilogenie op dié van die gasheer deur asimmetriese Procrustes-opeenligging van gasheer- en parasietafstandsmatrikse geassesseer, terwyl ParaFit die afhanklikheid van beide filogenieë op mekaar getoets het (Balbuena *et al.*, 2013; Legendre *et al.*, 2002). Vóór die analises is die buitegroepe vanaf die ML-filogenieë verwyder om kongruensie op die intraspesifieke peil te assesseer. Hierdie filogenieë van die gasheer en parasiet is tot matrikse van patristiese afstande deur die pakket *ape* (Paradis & Schliep, 2019) in R *weergawe* 4.0.2 (R Core Team, 2020) omgeskakel. Hierdie matrikse het as inset vir beide analises gedien, tesame met die ooreenstemmende gasheer-parasiet-assosiasiematriks, waar die polistomatiede aan hulle oorspronklike gasheerindividue toegeken is, of aan ’n gasheer met ’n identiese geenvolgorde as die oorspronklike gasheerindividu.

Die hoofkoördinate vir PACo is met die R-pakket *paco* (Hutchinson *et al.*, 2017) afgelei vir die Procrustes-opeenligging in samewerking met die Cailliez-korreksie (Cailliez, 1983) van nie-Euklidiese afstande. Die PACo-analise is in dieselfde R-pakket met 10 000 permutasies uitgevoer, waar die asimmetriese Procrustes-statistiek gebruik is en rysomme en aantal interaksies behou is (Hutchinson *et al.*, 2017). Die potensiële koëvolusionêre dinamiek van die gekoppelde klades is voorts ontdek deur dié interaksies wat die meeste tot die moontlike konkordansie tussen die twee filogenieë kon bydra met ’n j-uitsnitprosedure in die R-pakket *paco* uit te ken (Hutchinson *et al.*, 2017). Daardie interaksies met die geringste residu-afstande is as sterker ondersteuners van algehele kongruensie vertolk.

Die ParaFit-analise (Legendre *et al.*, 2002) is met die R-pakket *ape* (Paradis & Schliep, 2019) op grond van die patristiese afstandsmatrikse deur 10 000 permutasies met die Cailliez-korreksie (Cailliez, 1983) vir negatiewe eiewaardes uitgeoefen. Beide die ParaFitLink-toetse is gebruik om die beduidendheid van die individuele skakels te assesseer (Legendre *et al.*, 2002).

'n Warboelgram van die gasheer- en parasiet-ML-filogenieë met 'n geweegde interaksie-matriks is op basis van die residue wat deur PACo se j-uitsnitmetode gelewer is, met die R-pakket *phytools* gebou (Revell, 2012). Die funksie `cophylo` het 'n interne algoritme wat die vertakpunte roteer om takpunte optimaal te pas. As gevolg van die verwydering van duplikaatvolgordes kon sekere gashere en parasiete se terminale vertakpunte in meer as een interaksie betrokke wees.

6.3 Resultate

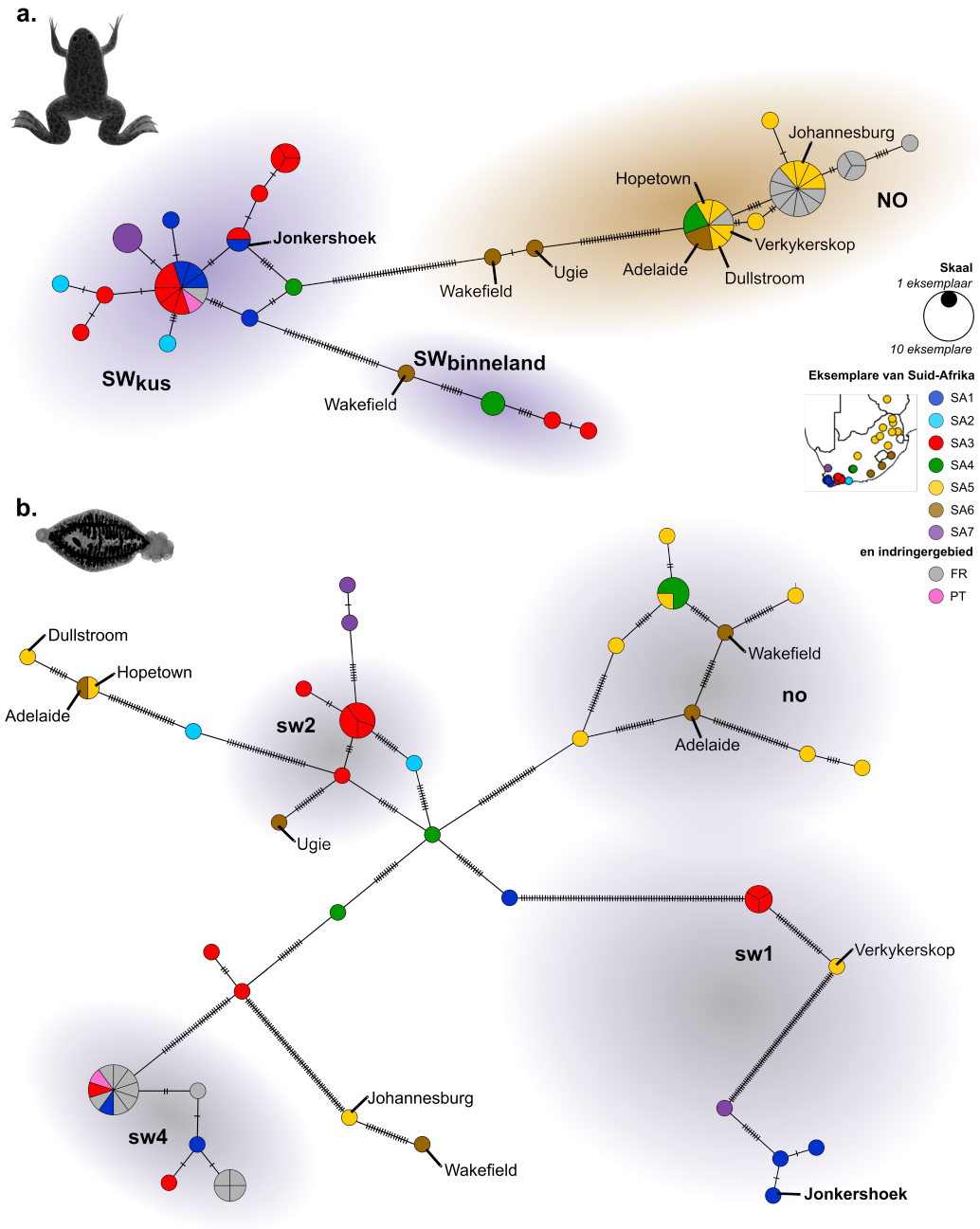
6.3.1 Volgordeverskeidenheid

Die besnoeide en aaneengeskakelde belyning van die twee gasheergene wat vir die netwerkanalises gebruik is, naamlik *COX1* (besnoei tot 641 bp) en *rrnS* (besnoei 369 bp), was 1010 bp lank. Die finale belyning het geen gapings bevat nie en dus is al die liggings benut. In die geval van die parasietgene het die totale belyning met 'n lengte van 901 bp, insluitend sewe ligging met gapings wat nie benut is nie, bestaan uit *COX1* van 416 bp en *rrnS* van 485 bp.

Analise van oortolligheid het 30 unieke volgordekombinasies in die aaneengeskakelde *X. laevis*-datastel met 23 unieke haplotipes van *COX1* en 10 van *rrnS* uitgeken. Inbegrepe die buitegroep *X. muelleri*, is 31 haplotipes vir die ML-analise belyn tot 'n totaal van 1153 bp waarvan 717 bp *COX1* en 436 bp *rrnS*, bestaande uit 189 liggings met weggelate data en 183 veranderlike liggings, waarvan 88 spaarsaamheidsinligtinggewend was. Insgelyks, ná die verwydering van duplikate het die aaneengeskakelde parasietbelyning 44 unieke *P. xenopodis*-volgordes bevat, 'n kombinasie van 34 unieke haplotipes van *COX1* en 35 van *rrnS*. Saam met die buitegroep *P. occidentalis*, het 45 *COX1*-volgordes van 423 bp en *rrnS*-volgordes van 511 bp oorsprong gegee tot 'n aaneengeskakelde belyning van 934 bp lank wat gebruik is om die ML-filogenie van die parasiet te verkry. Van hierdie liggings het 799 volledige liggings 225 polimorfiese liggings met 'n onderafdeling van 174 spaarsaamheidsinligtinggewende liggings bevat.

6.3.2 Gasheer en parasiet se filogeografiese trosvorming

Die paddahaplotipes is in 'n MSN uitgebeeld (Figuur 6.2). Padda-eksemplare van die SA5–6-liggings in die somerreënvalstreek is deur sewe unieke haplotipes voorgestel, terwyl die eksamplare van die winterreënvalstreek deur 15 unieke haplotipes voorgestel is. Die indringerpaddabevolkings van Frankryk en Portugal is deur vyf unieke haplotipes verteenwoordig.



Figuur 6.2: Mediaanspanhaplotiepnetwerk van die aaneengeskakelde gedeeltelike *COX1* en *rrnS* gene van: **a** – 59 eksemplare van *Xenopus laevis*; **b** – en hulle ooreenstemmende 59 *Protopolystoma xenopodis*-parasiete van hulle natuurlike en vreemde gebiede. Vir die *X. laevis* en hulle polistomatiede wat by 30 lokaliteite in die natuurlike gebied in suidelike Afrika versamel is (sien inlaskaart), verwys die kleure na die sewe filogeografiese stamlyne van die gasheer, volgens de Busschere *et al.* (2016). Koïngevoerde *X. laevis* en hulle polistomatiede van Frankryk (grys) en Portugal (pienk) is ook ingesluit. Trosse wat met die klades wat deur die MW-analises openbaar is, ooreenstem (sien Figuur 6.3), is die noordoostelike gasheer- (NO) en parasietklade (no) en die suidwestelike gasheer- (SW) en parasietklades (sw) en word met kleur uitgewys. Sleutelliggings waar gasheerwisseling bespeur is, word benoem, asook die haplotipe vanaf die bronligging, Jonkerhoek, waarvandaan die meerderheid van *X. laevis* uitgevoer is. Die sirkels se groottes is proporsioneel tot die haplotiepfrekwensies (sien sleutel). Die aantal mutasies is op die verbindingslyne aangebring.

Die MSN van die paddagasheer het die bestaan van drie hooffilogeografiese klades wat rofweg met die somer- en winterreënvalgebiede in die natuurlike gebied ooreenstem, gesteun (NO en SW-trosse in Figuur 6.2). Die noordoostelike paddatros het met NO in die padda se ML-boom ooreengestem (verwys na Figuur 6.3). Dié tros het paddaeksemplare van SA4–6 en Frankryk bevat. Die tros het ’n ’n stervormige topologie met twee dominante inheemse haplotipes en vier satelliethaplotipes wat met een tot sewe mutasies van die dominante haplotipe verwyderd was, vertoon. Padda-eksemplare van Wakefield en Ugie het soortgelyke haplotipes gehad wat tussen die twee hooftrosse gelê het. Hulle was onderskeidelik deur 29 mutasies van die naaste noordoostelike haplotipe afgesonder en met 45 mutasies vanaf die naaste suidwestelike haplotipe. Die suidwestelike paddatros het paddas van SA1–4, SA7, Frankryk en Portugal ingesluit en het met and SW_{kus} en $SW_{binneland}$ van die padda se ML-boom ooreengestem. Een sentrale dominante haplotipe in die suidwestelike tros het eksemplare van SA1 en SA4, asook Frankryk en Portugal, verteenwoordig. Satelliethaplotipes het vanaf die dominante suidwestelike haplotipe met ’n stervormige topologie uitgewaaier. Met die uitsondering van ’n tros met vier hoogs divergente haplotipes wat van die dominante haplotipe met 36 tot 50 mutasies verskil het, is die res van die haplotipes van die sentrale ene met een tot sewe mutasies geskei. Die eksemplare in die divergente suidwestelike tros het met $SW_{binneland}$ van die ML-boom ooreengestem en het boonop ook ’n eksemplaar wat in Wakefield (SA6) versamel is, bevat. Padda-eksemplare vanaf Drie Susters (SA4) was in die NO, SW_{kus} en $SW_{binneland}$-trosse te vinde.

Die filogeografiese stamlyne wat in die gasheer se ML-boom ontbloot is, was breedweg in die struktuur van die polistomatied-MSN weerspieël, behalwe vir **sw3** wat regdeur die netwerk versprei is (sien trosse **no**, **sw1–2,4** in Figuur 6.2). Hierdie het die verskeie onopgelosde verwantskappe tussen die polistomatiede wat van SA1–4 en SA7-liggings in die winterreënvalstreek versamel is, soos gesien in die ML-boom, weerklink.

’n Tros polistomatiedeksemplare van NO-gashere wat ooreenstem met **no** in die polistomatied se ML-boom het 12 van die eksemplare wat van SA4–6 versamel is, verteenwoordig. Die res van die polistomatiede van SA4–6-liggings was regoor die res van die netwerk versprei en het dus saam met polistomatiede vanaf die SW-gasheer gegroepeer. Hierdie eksemplare is dieselfde as dié wat as aanduiders van gasheerwisselings in die warboelgramanalise uitgeken is, naamlik polistomatiede wat in Adelaide, Dullstroom, Hopetown, Johannesburg, Ugie, Verkykerskop en Wakefield versamel is. Terselfdertyd was die polistomatiede wat naby Drie Susters (SA4) versamel is, ook oor die hele netwerk versprei.

Die polistomatiede van Frankryk en Portugal het saam as ’n dominante randhaplotipe, wat ook paddas van SA1 en SA3 bevat het, gegroepeer. Hierdie tros het verder twee satelliethaplotipes, wat met onderskeidelik twee of vier mutasies van die hooftros verskil het, bevat. Hierdie haplogroep van polistomatiedeksemplare van die uitheemse liggings, wat met die polistomatiede se ML-boom se **sw4**-klade ooreenstem, was met 255 tot 260

mutasies van die Jonkershoek-eksemplaar verwyderd. Polistomatiede wat koïngevoer is na die vreemde gebied het grotendeels in die teenoorgestelde filogeografiese stamlyne as hulle gashere gegroepeer, met almal behalwe een van die indringerpaddas van Frankryk wat saam met hulle inheemse eweknieë van die noordoostelike gebied (NO) gegroepeer het, terwyl hulle polistomatiede saam met die inheemse polistomatiede in die suidwestelike haplotipetrosse (**sw4**) gegroepeer het. Dit verteenwoordig die herhaalde gasheerwisseling deur die polistomatied van een klade van die gasheer na ander voor.

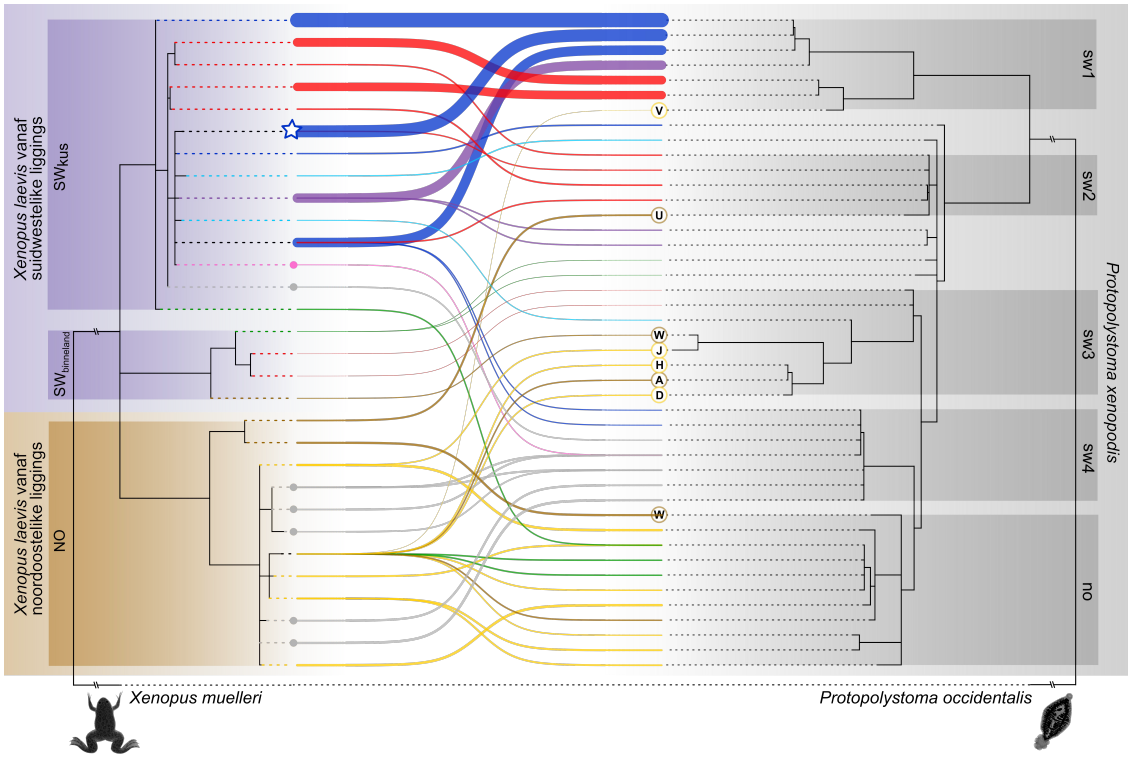
6.3.3 Gasheer- en parasietfilogenie en kongruensie

Boomrekonstruksie het aangetoon dat die paddas van die noordoostelike liggings in die natuurlike gebied (SA4–6) 'n welgesteunde klade gevorm het (klade NO in Figuur 6.3 met UFboot2 = 95% / SH-aLRT = 95.8%). Die geografiese oorsprong van hierdie klade het met die somerreënvalstreek in suidelike Afrika ooreengestem. Daarbenewens kon twee klades met onopgeloste verwantskappe tot mekaar en tot NO onder die versamelde paddas vanaf die suidwestelike liggings in die natuurlike gebied van *X. laevis* uitgeken word (klades SW_{kus} met UFboot2 = 81% / SH-aLRT = 86.1% en $SW_{binneland}$ met UFboot2 = 98% / SH-aLRT = 99.7% in Figuur 6.3). Hierdie twee klades was altwee van die winterreënvalstreek afkomstig, met lede van die eerste klade vanaf lokaliteite wat nader aan die kus lê (klade SW_{kus} in Figuur 6.3 van SA1–3, SA7-liggings) as die tweede klade (klade $SW_{binneland}$ in Figuur 6.3 from SA3–4, SA6-liggings).

Die twee liggings naby Drie Susters in die Karoo (SA4) word as 'n kontaksone tussen NO, SW_{kus} en $SW_{binneland}$ aan die hand gedoen, met versamelde individue van hierdie liggings wat in al drie die gasheerstamlyne te voorskyn het. Net so was paddas van Wakefield (SA6) naby Lesotho ook teenwoordig in beide NO en $SW_{binneland}$.

Die uitheemse padda van die indringerbevolking in Portugal, saam met die uitheemse paddas van westelike Frankryk, het met die inheemse paddas van SW_{kus} in Suid-Afrika in die gasheerfilogenie gegroepeer, wat dus hierdie eksotiese paddas in dieselfde klade as die padda van Jonkershoek geplaas het. Nogtans het die indringerbevolking van *X. laevis* in Frankryk ook 'n aantal paddas van die inheemse noordoostelike klade gehuisves (sien Figuur 6.3).

Op dieselfde wyse as in die gasheerfilogenie het die ML-inferensie van die *P. xenopodis*-boom 'n enkele, gesteunde klade van polistomatiede van gashere van die noordoostelike liggings blootgelê (klade **no** in Figuur 6.3 van die SA4–6-liggings met UFboot2 = 97% / SH-aLRT = 87.6%). Verskeie klades wat basaal tot die noordoostelike groep gegroepeer het, kom van die polistomatiede van gashere wat vanaf die suidwestlike streek versamel is (klades **sw1–4** van die SA1–4 en SA7 liggings in Figuur 6.3). Die vroegste divergerende klade is 'n gesteunde groepering van polistomatiede wat van SA1, SA3 en SA7 versamel



Figuur 6.3: Die interaksienetwerk en maksimumwaarskynlikheidsfilogenieë van die padda *Xenopus laevis* (links) en sy polystomatied *Protopolystoma xenopodis* (regs) met die naverwante *X. muelleri* en *P. occidentalis* as buitegroepe. Topologieë is op die maksimumwaarskynlikheidsanalises van die aaneengeskakelde *COX1* en *rrnS* geenbelynings van 31 h=gashere en 45 parasiete gebaseer met die swak ondersteunde klades (UFboot2 $<$ 95% of SH-alrt $<$ 80%) op hulleself ingevou. Gekleurde lyne dui die waargenome gasheer-parasiet-assosiasies aan en is met die bydrae van elke interaksie tot die algehele filogenetiese kongruensie belas, met dikker lyne wat ooreenstem met groter ondersteuning. Kleure van die lyne stem met die geografiese oorsprong van die verteenwoordigende eksemplaar van elke unieke volgorde ooreen, volgens die filogeografiese stamlyne van de Busschere *et al.* (2016): SA1 (donkerblou), SA2 (ligblou), SA3 (rooi), SA4 (groen), SA5 (geel), SA6 (bruin) en SA7 (pers) (sien Figuur 6.1) met verheldering van die hoofstamlyne. Gasheerklades van die noordooste (NO) en suidweste (SE) en parasietklades van die noordooste (no) en suidweste (sw1–4) wat goeie ondersteuning geniet, word aangedui. Indringer-*X. laevis* en koïngevoerde *P. xenopodis* van Frankryk (grys) en Portugal (pienk) word ook ingesluit. Sleutelliggings is Adelaide (A), Dullstroom (D), Hopetown (H), Johannesburg (J), Ugie (U), Verkykerskop (V) en Wakefield (W). Jonkershoek (☆) is die bron van die meerderheid van uitvoere van *X. laevis* tot op hede.

is (klade **sw1** in Figuur 6.3 met UFboot2 = 94%/SH-alrt = 88.1%). Twee ander inheemse suidwestelike klades het ’n klade van polistomatiede van die SA3-liggings ingesluit (klade **sw2** in Figuur 6.3 met UFboot2 = 53%/SH-alrt = 90.7%) en ’n ander klade het ’n kombinasie van SA2 en SA3-liggings bevat (klade **sw3** in Figuur 6.3 met UFboot2 = 61% / SH-aLRT = 86.6%). Nog ’n gesteunde klade, die susterklade van **no** het polistomatiede vanaf SA1, Frankryk en Portugal bevat (klade **sw4** in Figuur 6.3 met UFboot2 = 100% / SH-aLRT = 100%). Desondanks het algehele lae steunwaardes van heelparty interne vertakpunte in die parasiete se ML-boom die interpretasie van filogenetiese trosvorming tussen sommige van die polistomatiede wat van die winterreënvalstreek (SA1–4 and SA7) versamel is, bemoeilik.

Die filogenie van *X. laevis* het beduidende globale kongruensie met dié van *P. xenopodis* (PACo m^2_{xy} = 0.1034, *p* = 0.0018, n = 10000; ParaFitGlobal = 0.0202, $p < 0.0001$, n = 10000) openbaar, waar die PACo-analise aangedui het dat die filogenie van *P. xenopodis* dié van *X. laevis* gevolg het. Volgens PACo het die skakels tussen die paddas van SW_{kus} en hulle ooreenstemmende polistomatiede wat deel vorm van **sw1** in die parasietfilogenie in die reël die meeste tot die globale filogenetiese kongruensie bygedra. PACo se j-uitsnitprosedure het verder die interaksies tussen die padda– polistomatied-pare van die vreemde gebiede in Frankryk en Portugal uitgesonder as skakels wat min steun aan kongruensie verleen. Bowendien het die interaksies tussen paddas en polistomatiede van die kontaksone naby Drie Susters (SA4) en Wakefield (SA6) lae steun aan globale kongruensie verleen, wat wys dat gasheerwisseling by hierdie liggings plaasgevind het. Die ParaFitLink-toetse het gemeld dat 30 uit die 48 skakels beduidend teen die 0.05-vlak was. Onder die 18 skakels wat nie beduidend die kongruensie steun nie, het 11 gasheerwisseling deur parasiete na ’n ander gasheerstamlyn aangedui. Dit het in die vreemde gebied in Frankryk en Portugal en in die natuurlike gebied naby Johannesburg, Drie Susters, Ugie en Wakefield plaasgevind.

’n Paar skakels het wanpassings tussen die gasheer- en parasietfilogenieë voorgestel wat verklaar kan word deur gasheerwisseling na afloop van langafstand verplasing van die SW-gasheerstamlyne na die somerreënvalstreek gevolg deur oorspoel van polistomatiede na gashere in NO. Hierdie aanduidings van gasheerwisseling is in padda-polistomatied-pare van Dullstroom, Hopetown, Johannesburg en Verkykerskop van SA5 en Adelaide, Ugie en Wakefield van SA6 opgemerk. Onder hierdie het die polistomatiede van Adelaide, Dullstroom, Hopetown, Johannesburg en Wakefield met redelike steun saamgegroepeer (UFboot2 = 54% / SH-aLRT = 81.3%) in **sw3** saam met polistomatiede wat by SA2 en SA3-liggings versamel is.

6.4 Bespreking

In die huidige studie het die kofilogeografiese analise van ’n wêreldwye indringer gasheer-parasiet-sisteem beduidende kongruensie tussen die intraspesifieke filogenie van die padda *X. laevis* en sy polistomatied *P. xenopodis* openbaar. As gevolg hiervan, is die *X. laevis* en *P. xenopodis* gasheer-parasiet-sisteem by uitstek geskik vir ’n vergelykende filogeografiese ondersoek (Nieberding & Olivieri, 2007) in die konteks van intraspesifieke kriptiese indringing.

6.4.1 Parasiettrosvorming weerspieël die intraspesifieke filogeografie van die gasheer

Die filogeografiese analise van die parasiet *P. xenopodis* lê merkbare intraspesifieke geografiese strukturering regoor die natuurlike gebied van hierdie spesie bloot. Dié is 'n onafhanklike bewyslyn wat die bevindinge van die filogeografiese analise van die gasheer *X. laevis*, wat ook merkbare filogeografiese trosvorming oor die natuurlike bied toon (de Busschere *et al.*, 2016; du Preez *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2015; Grohovaz *et al.*, 1996; Measey & Channing, 2003), bekragtig en uitbou.

Die geneties onderskeidbare gasheer-parasiet-trosse vertoon verspreidings wat rofweg deur die twee klimaatstreke in die gebied gevorm word, naamlik die somerreënvalstreek na die noordooste en die winterreënvalstreek na die suidweste, met die platorand van die Groot Eskarp as 'n veronderstelde versperring tot uitbreiding (Furman *et al.*, 2015). Die meer uitgesproke trosvorming onder die gashere en parasiete wat vanaf die winterreënvalstreek aan die suidwestekant van die Groot Eskarp vandaankom ($SW_{\text{binneland \& kus}}$ en **sw1–4**), is waarskynlik deur die teenwoordigheid van die vele riwwe van die Kaapse Plooiberge meegebring (de Busschere *et al.*, 2016; du Preez *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2015; Grohovaz *et al.*, 1996; Measey & Channing, 2003). Nietemin, die welopgetekende mensbemiddelde verplasing van *X. laevis* in die Kaap (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007), tesame met wydverspreide oorlandse migrasie van die padda met behulp van aaneengekoppelde mensgemaakte waterliggame in die streek (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2016), kan weer veroorsaak dat duidelike filogeografiese kensketsing in hierdie area op ons vlak van versamelingspoging moontlik verberg is.

6.4.2 Parasietoorspoel is 'n aanduiding van kontak tussen divergente gasheerstamlyne

Parasietfilogeografie bied 'n hulpmiddel om geskiedkundige insigte oor gasheeruitbreidingsroetes te bekom, aangesien hulle vervloë interaksies tussen gasheerorganismes by beide onlangse en dieper tydskale reflekteer (bv Galbreath *et al.*, 2020). Die nut van parasietspesies juis in die weerspieëling van die invoerroetes van hulle gashere is telkemale vir visgashere en hulle monogeneërparasiete uitgewys (Huyse *et al.*, 2015; Kmentová *et al.*, 2019; Ondračková *et al.*, 2012). In ons studie tree die etlike gevalle van gasheerstamlynwisseling, wat deur die filogeografiese analise van *P. xenopodis* openbaar is, op as 'n aanduider van kontak tussen filogeografies onderskeibare stamlyne van *X. laevis*, selfs al kan die kontaksones nie deur die analise van die gasheerfilogeografie tentoongestel word nie. Na ons beste wete is hierdie die eerste gebruik van parasietmerkers om intraspesifieke kriptiese indringings na te speur, alhoewel veelkantige benaderings tot hierdie probleem al voorheen sukses behaal het (bv Clavero *et al.*, 2016).

Tot dusver is daar nog nie genetiese bewyse vir die bymenging van die stamlyne van *X. laevis*, wat natuurlik aan teenoorgestelde kante van die Groot Eskarp voorkom, gevind nie, ten spyte daarvan dat geskiedkundige optekeninge grootskaalse uitvoere vanaf die winterreënvalstreek na die res van suidelike Afrika suggereer (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). In ons studie stel die gasheerfilogeografie die teenwoordigheid van kontaksones tussen die noordoostelike (NO) en suidwestelike stamlyne ($SW_{binneland\ \&\ kus}$) by twee liggings in die somerreënvalstreek aan die noordekant van die Groot Eskarp voor. Aangesien hierdie sone aan die noordekant van 'n veronderstelde geografiese versperring lê (Furman *et al.*, 2015), sou ons kon bespiegel dat die antropogeniese verplasing 'n aandeel het aan hierdie simpatrie van verskeie klades van *X. laevis*.

Meer bewyse vir die onlangse antropogeniese verplasing van *X. laevis* regoor suidelike Afrika word deur die teenwoordigheid van suidwestelike parasietstamlyne (**sw1–3**) by sewe liggings in die somerreënvalstreek voorsien. In hierdie gevalle behoort gashere van liggings in die noordoostelike somerreënvalstreek aan die verwagte NO-klade, tog lê hulle parasiete binne die suidwestelike parasietklades (**sw1–3**). Simpatrie van verskillende gasheerstamlyne is 'n voorvereiste vir gasheerwisseling. Só kan parasietstamlyne wat saam met hulle onderskeie gasheerstamlyne verplaas is (plaaslik uitheems) oorspoel na ander gasheerstamlyne (plaaslik inheems) as hierdie divergente, voorheen allopatriese gasheerstamlyne in kontak kom. Dit verskaf aan ons die middele om onlangse kontak tussen stamlyne van *X. laevis* te herken, selfs in gevalle waar die oorspronklike, plaaslik uitheemse gasheerstamlyne uitgesterf het ná die invoeringgeleentheid of waar hulle nie teen 'n sekere vlak van versamelpoging opgespoor is nie.

Differensiële oorlewing tussen plaaslik inheemse en uitheemse stamlyne van *X. laevis* in suidelike Afrika kan gedeeltelik die weiniger waargenome gevalle van vestiging deur uitheemse stamlyne van *X. laevis* in vergelyking met sy koïngevoerde polistomatied verklaar. In verplasingseksperimente van die verskillende stamlyne in die natuurlike gebied, het *X. laevis*-paddavissies en -metamorfies merkwaardige fenotipiese plastisiteit ten koste van langtermynoorlewing tentoongestel wanneer dit tussen reënvalstreke verplaas is (Kruger, 2020). Onder hierdie omstandighede sal die plaaslik inheemse stamlyne van *X. laevis* die uitheemse stamlyne uitkompeteer, wat suksesvolle plaaslike indringing sal teëstaan. Dus, die gebruik van gasheerfilogeografie op sy eie om langafstand verplasing van *X. laevis* in suidelike Afrika te volg, sal invoergeleenthede verberg.

Met aankoms in die nuwe area kan die koïngevoerde *P. xenopodis* vinnig in 'n bevolking van plaaslik inheemse en dus naïewe *X. laevis* versprei. Dit is al bewys dat primêre infeksies deur *P. xenopodis* in voorheen ongeïnfekteerde *X. laevis*-gashere 'n sterk langtermyn immuunrespons teen sekondêre infeksies deur dieselfde parasietspesies ontketen (Jackson & Tinsley, 2001b). Dienooreenkomstig het 'n kruisbesmettingseksperiment tussen simpatriese en allopatriese *X. laevis* en *P. xenopodis*-stamlyne verder daarop gedui dat *X. laevis*-stamlyne in hulle natuurlike gebied moontlik meer vatbaar is vir infeksie met

die plaaslik koïngevoerde *P. xenopodis*-stamlyn as vir hulle ooreenstemmende plaaslik inheemse parasietstamlyn (Jackson & Tinsley, 2005). Nie net sal *P. xenopodis* naïewe *X. laevis* meer geredelik infekteer nie, maar multiwurmbesmetting in 'n enkele padda verhoog die aanvanklike voortplantingskoers van die polistomatied (Jackson & Tinsley, 1988). Op sy beurt sal hierdie effek die ontluikende verspreiding van die koïngevoerde *P. xenopodis* in die plaaslik inheemse stamlyn van *X. laevis* teweegbring.

Die aanduidings van parasietoorspoeling wat deur ons analise van die polistomatiedfilogeografie ontbloot is, stel voor dat kleinskaalse mensbemiddelde verspreidingsgeleenthede, in teenstelling met die groot amptelike besendings vanaf die somerreënvalstreek na sentra van hoër onderrig regoor Suid-Afrika, vêrreikende effekte kan hê. Die rol van hengelsport regoor Suid-Afrika in die verspreiding van *X. laevis* en daarmee saam *P. xenopodis* is al herken (Weldon *et al.*, 2007). Voorheen opgetekende onderhoude met plaaslike hengelaars en verskaffers het die gebruik van *X. laevis*, wat by troeteldierwinkels en plaaslike telers aangeskaf is, as lewende aas vir hoofsaaklik baberhengelary aan die lig laat kom (Weldon *et al.*, 2007). Ons eie informele gesprekke met plaaslike hengelaars by die liggings waar ons *X. laevis* versamel het, beaam die wydverspreide gebruik van *X. laevis* as lewende aas vir die vangs van beide swartbaars en babers.

Bloot op grond van die aantal is die invloed van hierdie verplasingsgeleenthede op die plaaslike uitbreiding van *X. laevis* gereken as weglaatbaar in vergelyking met die uitvoere vanaf Jonkershoek en ander amptelike verskaffers aan die plaaslike mark (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Nogtans het vorige studies daarop gewys dat die gebruik van lewende aas in hengelary 'n belangrike invoerroete is, selfs al is die mark klein vanuit 'n ekonomiese oogpunt (Kalous *et al.*, 2013; Kilian *et al.*, 2012). Derhalwe moet die invloed van hengelaars op die verspreiding van *X. laevis* na meer afgeleë areas, teenoor die groot sentra wat die opgetekende amptelike besendings ontvang het, nie onderskat word nie. Ons informele onderhoude het verskeie maniere ontbloot waarmee *X. laevis* in nuwe omgewings deur hengelaars vrygelaat kan word, van ontsnappings langs die pad, tot die opsetlike vrystelling van oorskot-aas, tot die doelbewuste vestiging van voorrade in waterliggame vir toekomstige gebruik. Al die bewyse dui daarop dat daar 'n omvangryke onopgetekende verspreidingsnetwerk van *X. laevis* in Suid-Afrika bestaan.

6.4.3 Parasietfilogeografie is 'n onontginde hulpmiddel in indringerbiologie

Soos hierbo uiteengesit, sien ons dat die huidige studie as 'n konsepbewys vir die potensiaal van die kofilogeografiese benadering tot die uitklaring van patrone in intraspesifieke gasheerdivergering en -uitbreiding na vore tree. Op sy beurt kan dié onafhanklike bewyslyn weer ten diepste aanvullende insigte oor indringerroetes en bestuurstrategieë belig.

Ons benadering was daartoe instaat om 'n vars insig te verskaf oor die oorsprong van die relatief hoë haplotiepverskeidenheid van die indringerbevolking in Frankryk, soos wat in ons analise en andere s'n na vore gebring is, in vergelyking met ander indringerbevolkings in Portugal, Sisilië en Chili (de Busschere *et al.*, 2016; Lillo *et al.*, 2013; Lobos *et al.*, 2014). Die konsep van verskeie invoergeleenthede vanaf meerdere bronbevolkings in Suid-Afrika is al voorheen as die mees spaarsame verduideliking vir hierdie hoë genetiese verskeidenheid geopper (de Busschere *et al.*, 2016). Aangesien ons reeds in die natuurlike gebied bewyse vir gasheerwisseling gevind het, wat beslis die simpatrie van divergente gasheerstamlyne benodig, is dit 'n sekerheid dat verskeie gasheerstamlyne saam by sekere liggings in die natuurlike gebied kan voorkom. Hier bou ons resultate op die bewyse wat verskaf word deur geskiedkundige uitvoeroptekenings (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007), verspreidingspatrone (de Villiers & Measey, 2017; Measey, 2016) and staaltjies (Weldon *et al.*, 2007). Daarom het die vermenging van stamlyne bes moontlik reeds in die bronbevolkings in Suid-Afrika plaasgevind, vóór die koïnvoering van *X. laevis* en *P. xenopodis* na westelike Frankryk, bykomend tot die vermenging wat deur verskeie invoergeleenthede vanaf 'n aantal uitvoerders regoor Suid-Afrika meegebring is (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007).

Die nuwe insigte wat met die toevoeging van die parasietdatastel gepaardgaan, het implikasies vir beide die bewaring van *X. laevis* en sy gasheerspesifieke parasiete. Die wydverspreide antropogeniese verplasing van hierdie gasheer-parasiet-sisteem ontwrig interaksies tussen stamlyne van *X. laevis* en die stamlyne van *P. xenopodis* wat hulle filogenetiese divergensie nagespeur het, oeroue interaksies wat juis die teikens van bewaring moet wees (Gómez & Nichols, 2013). In die besonder as dit kom by gasheerspesifieke parasiete, kan die verplasing van stamlyne in die natuurlike gebied van 'n spesie meer nadelig wees as hul verplasing na 'n vreemde ekosisteem waar naverwantes aan die oorspronklike gasheer nie teëgekom sal word om gasheerwisseling aan te wakker nie (Blackburn & Ewen, 2017). Gasheer-parasiet-interaksies moet ook voor oë gehou word met die uitvoering van bewaringsherbevolkingsprogramme, waar aangehoude of plaaslike uitheemse individue van 'n spesie gebruik word om plaaslik uitgestorwe bevolkings van bedreigde spesies weer te vestig (Britt *et al.*, 2004).

Verder blyk hierdie benadering heel belowend vir die bestuur van indringerspesies te wees. In risikobepaling moet antropogeniese verplasings in die natuurlike gebied wat reeds die bronbevolkings van indringerspesies kon verander het, in ag geneem word om genoegsame monitering van die indringerverloop van die nuwe interaksies wat voort kan spruit, te bied. Dit gebeur geredelik dat parasiete as meelopers van die indringers die aandag van indringerbioloë ontwyk (Blackburn & Ewen, 2017; Solarz & Najberek, 2017). Tog kan die rol van parasiete aan't bewege in ontluikende infeksiesiektes en habitattransformasie via indirekte digtheidsbemiddelde effekte, nie oorbeklemtoon word nie (Amundsen *et al.*, 2013; Bobadilla-Suarez *et al.*, 2017; Daszak, 2000; Dunn *et al.*, 2012; Lymbery *et al.*, 2014; Roy & Lawson Handley, 2012; Sures *et al.*, 2017).

6.4.4 Gevolgtrekking en aanbevelings

Op langelaas stem ons bevindinge ooreen met die noodsaaklikheid van ’n meer holistiese benadering to dataversameling in indringerbiologie (Clavero *et al.*, 2016). Die idee van die ”holistiese eksemplaar” het onlangs heelwat opgang gemaak (Cook *et al.*, 2017). Hierdie benadering tot die versameling en studie van organismes steun geïntegreerde eksemplaar-gebaseerde studies van diere en hulle geassosieerde parasiete en patogene. Die huidige studie wys dat die optekening van die parasietverskeidenheid van inheemse en uitheemse bevolkings van gashere duidelik tot meer inligting kan lei om vrae in indringerbiologie aan te pak. Die optimalisering van monsternemingspogings is krities om die toedeling van hulpbronne te verbeter, beide ten opsigte van befondsing en eksemplaarverbruik, veral as daar met bedreigde spesies of eksemplare wat moeilik bekombaar is, gewerk word, of in die lig van ander etiese kwessies. Boonop kan die stoor van kontrole-eksemplare van beide gasheer en parasiet onmisbaar wees vir latere studies (Thompson *et al.*, 2021).

Uiteindelik dien hierdie studie as ’n konsepbewys dat die gebruik van parasietdatastelle waarde tot ondersoeke in indringerbiologie sal voeg, veral in die geval van intraspesifieke kriptiese indringings. Om die waarheid te sê, ons wys dat die gebruik van parasietdatastelle meer kan bereik as om bloot aanvullende bewyse te voorsien en dat dit kan strek tot by die lewering van hoër resolusie wat kan lei tot die toeligting van patrone wat nie in die gasheerdatastel opgespoor kon word nie. In hierdie studie is die wydverspreide, tog tot dusver verborge, plaaslike uitbreiding van *X. laevis* met behulp van die hengelarygemeenskap as ’n vername rolspeler, aan die groot klok gehang deur die filogeografie van sy koïndringerparasiet, *P. xenopodis*, ’n aspek van die indringergeskiedenis wat grootliks agterweë gelaat is. Op die pad vorentoe bepleit ons dat die insluiting van koïngevoerde parasiete in die studie van indringerspesies, reeds gedurende die fase van eksemplaarversameling, inferensievooruitsigte sal verbeter sonder die verdubbeling van monsternemingspogings.



Hoofstuk 7

Beweegruimte: Die kompakte mitochondriese genoom van die indringerplatwurm *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) toon hoë intraspesifieke veranderlikheid

7.1 Inleiding

As dit kom by die beantwoording van vrae in taksonomie, evolusie en selfs ekologie, dan is mitochondriese DNA gewoonlik die mees gewilde molekulêre merker. Die veelsydigheid van mitochondriese merkers word tentoongestel in die onlangse wetenskaplike ondersoeke van die monogeneërplatwurmfamilie Polystomatidae Gamble, 1896. In die besonder is die mitochondriese *COX1*-geen, tesame met twee diskriminante morfologiese kenmerke, voorgehou as 'n effektiewe prosedure vir polistomatieduitkenning (Héritier *et al.*, 2018). Divergering in die *COX1*-geen word gereeld gebruik om tussen naverwante polistomatiedspesies en -genera te onderskei (Berthier *et al.*, 2014; Chaabane *et al.*, 2019; du Preez *et al.*, 2017, 2019; Landman *et al.*, 2021; Rahariviololoniaina *et al.*, 2011). Insgelyks het die *COX1*-geen, saam met die mitochondriese *rrnS*-geen en twee nukleêre merkers, gehelp om taksonomiese kwessies tussen genera in die Polystomatidae op te klaar (Chaabane *et al.*, 2019; du Preez *et al.*, 2017; du Preez & Verneau, 2020).

Die Polystomatidae se unieke band met tetrapoodgashere in die hoofsaaklik visparasite-

rende Monogenea maak dit 'n boeiende onderwerp van filogenetiese, kofilogenetiese en filogeografiese studies. Filogenetiese ondersoeke van lede van die Polystomatidae, gebaseer op beide mitochondriese en nukleêre merkers, het 'n lang koëvolusionêre geskiedenis tussen dié monogeneërs en hulle gashere bevestig (Héritier *et al.*, 2015). Hierdie studies kon selfs inligting oplewer oor die kolonisering en diversikasie van hulle hoogs bedreigde anuraangashere op Madagaskar (Verneau *et al.*, 2009). Eweseer is hierdie merkers gebruik om voorouerlike gasheerwisselings deur polistomatiese vanaf amfibieë tot ander akwatiese Tetrapoda te kenne te gee, wat die konneksie tussen polistomatiedevolusie en sleutelgebeurtenisse in tetrapoodevolusie beklemtoon (Héritier *et al.*, 2015). Bowendien wys filogenie gebaseer op die aaneengeskakelde mitochondriese *COX1* en nukleêre *28S rRNA*-gene dat gasheerwisseling eerder as binne-gasheer verdubbeling spesiëring in hierdie familie gedryf het (Littlewood *et al.*, 1997).

Nader aan die teenswoordige tyd kan mitochondriese merkers die rol van polistomatiede as biologiese indringers belig. Byvoorbeeld, die *COX1*-geen tree as 'n waardevolle molekulêre staafkode na vore wat die inheemse parasietfauna kan onderskei van die koïngevoerde parasiete van die berugte indringervarswaterskilpad *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1838), waarvan sommige koïndringers geword het tydens parasietoorspoeling na inheemse gashere (Héritier *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2015; Verneau *et al.*, 2011). Die feit dat *COX1*-staafkodes gebruik kan word om polistomatiedspesies uit te ken, bloot gebaseer op sifting vir polistomatiedeiers sonder dat dit nodig is om die bedreigde gasheerspesies te dissekteer, maak mitochondriese merkers 'n besonder aanloklike manier om spesie-uitkenning in studies in biologiese indringing waar polistomatiede betrokke is, aan te pak (Héritier *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2015; Verneau *et al.*, 2011). Net so kan die sagte weefsel van herwonne parasiete soms deur versameltegnieke beskadig word, soos dit die geval was vir die koïngevoerde polistomatied *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 van die wêreldwye indringer, die gewone platanna *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), wat via die *COX1*-staafkode in sy vreemde gebied in westelike Frankryk uitgeken is (Schoeman *et al.*, 2019).

As 'n trappie bo blote spesie-uitkenning het die filogeografiese analise van die mitochondriese *COX1* en *rrnS*-gene van *P. xenopodis* die kriptiese invoering van plaaslike indringerstamlyne van die gasheer *X. leavis* in sy natuurlike gebied van suidelike Afrika uitgewys (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif). Vóór hierdie analises is daar bespiegel oor die status van *X. laevis* as 'n plaaslike indringer (Measey & Davies, 2011; Measey *et al.*, 2017; van Sittert & Measey, 2016). Nogtans het filogeografiese analises van die gasheer regoor die natuurlike gebied dit nie reggekry om genetiese bewyse vir die uitbreiding van uitheemse stamlyne van die gasheer aan te dui nie (de Busschere *et al.*, 2016; Furman *et al.*, 2015). Dit was slegs met die aanvullende bewyslyn wat deur die intraspesifieke analise van die polistomatied se mitochondriese merkers gelewer is, dat die onlangse kontak tussen divergerende stamlyne van *X. laevis* in sy natuurlike gebied, gevolg deur oorspoeling van plaaslik uitheemse *P. xenopodis* na naïewe *X. laevis*-gashere, aangewys

is (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif).

In hierdie kofilogeografiese studie (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif) is die twee mitochondriese merkers op grond van die beskikbaarheid van voorvoerders gekies, eerder as op grond van *a priori* kennnis van die bevolkingspeilveranderlikheid. Alhoewel merkbare divergering in hierdie mitochondriese merkers van *P. xenopodis* in Suid-Afrika gevind is, kon daar nie tussen bevolkings onderskei word op die fynere streekskaal nie (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif). Die intraspesifieke vergelyking van die mitochondriese genome (mitogenome) van diplosoïed-, girodaktilied- en daktilogiriedmonogeneërs het aangedui dat ander gene dalk meer geskik sal wees vir spesie-uitkenning of selfs bevolkingspeilstudies in hierdie families (Huyse *et al.*, 2008; Vanhove *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b). Terselfdertyd het die variasie in nukleotiedverskeidenheid in monogeneërmitogenome op die intraspesifieke vlak maar min aandag gekry (met uitsondering van Huyse *et al.*, 2008; Solá *et al.*, 2015). Daarom sal die karakterisering van die volledige mitogenoome van *P. xenopodis*, gevolg deur die intraspesifieke vergelyking van nukleotiedverskeidenheid, die keuse van mitochondriese merkers toelig, wat ons sal toelaat om met meer sekerheid die oorsprong en uitbreiding van indringerpolistomatiede te ontsyfer.

Die afgelope vier dekades het die opgang van mitochondriese genomika meegemaak, van die volgordebepaling van die eerste twee volledige mitogenome in 1981 (Anderson *et al.*, 1981; Bibb *et al.*, 1981) tot die beskikbaarheid van oor die 12 000 volledige mitogenome op die openbare bewaarplek GenBank teen Maart 2021 (National Center for Biotechnology Information, 2021). Ondanks die stortvloed van beskikbare mitochondriese data (Smith, 2015), word platwurm tans deur ’n skamele 152 inskrywings verteenwoordig (National Center for Biotechnology Information, 2021). Onder hierdie is die eerste drie volledige monogeneërmitogenome in 2007 bepaal en geannoteer (Huyse *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Plaisance *et al.*, 2007), maar hierdie klas as ’n geheel is steeds onderverteenwoordig (Wey-Fabrizius *et al.*, 2013). In die Polystomatidae is daar slegs een onvolledige, voorlopige mitogenoom op GenBank beskikbaar – die van die padda-parasiterende *Diplorchis hangzhouensis* Zhang *et* Long, 1987 van Asië (Zhang *et al.*, ongepubl.).

Die diverse en apomorfiese gasheerassosiasies van die Polystomatidae (Héritier *et al.*, 2015), gekoppel met die basale posisie van hierdie familie in die poliopistokotileërfilogenie (Mollaret *et al.*, 2000), beklemtoon hulle evolusionêre belang in die Monogenea. Met dien verstande dat baie van die Polystomatidae koïngevoerde en selfs koïndringerparasiete is (Héritier *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2015; Schoeman *et al.*, 2019; Verneau *et al.*, 2011, Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif), is dit duidelik dat ’n vollegige mitogenoom van ’n verteenwoordiger van hierdie familie baie nuttig sal wees vir toekomstige ondersoekers. Daar is in die besonder ook ’n nut vir mitochondriese merkers wat groter intraspesifieke onderskeidingskrag tentoonstel as die *COX1* en *rrnS*-gene wat tans gebruik word. Die nuwe merkers sal ons in staat stel om die uitbreiding van die indringergashere van Amphibia en Chelonia teen fyner geografiese skale na te speur.

Dientengevolge reik ons die eerste volledige mitogenoom van die wêreldverspreide polistomatiedmonogeneër *P. xenopodis* uit. Die mitogenome van twee eksemplare is bepaal, gemonteer en gekarakteriseer, waarna hulle vergelyk is met die mitogenome van ander parasitiese platwurms van die subklas Polyopisthocotylea Ohdner, 1912. As 'n voorlopige intraspesifieke analise het ons die mitogenoomvolgordes van twee eksemplare van *P. xenopodis* vanaf dieselfde bevolking van gashere in die somerreënvalstreek van Suid-Afrika vergelyk.

7.2 Metodes

Ses volwasse *X. laevis* is in lewergeaasde tregterfuike in twee aaneengeskakelde waterliggame naby Bloemfontein, Suid-Afrika (29.06363°S; 26.21881°E) in November 2019 gevang. Hierdie ligging is naby die kampus van die Universiteit van die Vrystaat geleë, 'n instelling wat gereeld *X. laevis* vir onderrig- en navorsingsdoeleindes van beide die somer- (Lydenburg-visbroeiery, Mpumalanga-provinsie) en winterreënvalstreke (verskaffer in Vishoek-area, Wes-Kaap-provinsie) in Suid-Afrika ingevoer het (Louis du Preez, persoonlike kommunikasie). Vanaf hierdie stapels het daar op gereelde grondslag *X. laevis* ontsnap of is hulle sommer direk aan troeteldierwinkels of plaaslike hengelaars verskaf, wat op hul beurt in nabygeleë waterliggame kon vestig (Louis du Preez, persoonlike kommunikasie).

Die paddas is gevang, om die lewe gebring volgens internasionaal aanvaarde standaardwerkprosedures en inwendig en uitwendig vir parasiete ondersoek onder die Noordwes-Universiteit AnimCare-etieknommer NWU-0380-16-A5-01. Agtien eksemplare van *P. xenopodis* is vanuit die blase van hierdie gashere herwin en in 70% etanol vir verdere molekulêre analises gefikseer.

Totale genomiese DNA is vanaf twee heel eksemplare geëekstraheer deur van 'n geoptimiseerde protokol vir lae-inset-DNA-monsters gebruik te maak. Aanvanklike vertering is in 195 μl TNES-buffer (400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0.5% SDS) en 5 μl proteinase-K (20 mg/ml) teen 55°C vir $\sim$30–60 minute uitgevoer. DNA is in 'n mengsel van 65 μl 5 M NaCl en 290 μl 96% etanol met gis-tRNA as draer laat neerslaan, in -20°C vir 1 uur gestoor en met drie rondtes van 1 ml verkilde 70% etanol gesuiwer. Gesuiwerde DNA is in 100 μl 0.1X TE-buffer met 0.02% tween-20 geelueer. NGS-biblioteke is van elke eksemplaar met 'n Nextera DNA Flex voorberei. Gelyktydige gepaarde end volgordebepaling (2 $\times$ 151 bp) op Illumina HiSeq X Ten-sisteemsystem is uitgekontrakteer.

Grepies is van die verkrygde lesings besnoei deur fastp (Chen *et al.*, 2018) en verder gesif volgens 'n minimumlengte van 40 bp deur Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Die mitogenome is monteer vanaf die twee stelle besnoeide en gepaarde lesings van elke eksemplaar in NOVOPlasty *weergawe* 3.7.2 (Dierckxsens *et al.*, 2017) met die gedeeltelike

COX1-geen van *P. xenopodis* (MK342938; Schoeman *et al.*, 2019) as saadjie. Verwagte monteringslengte is van 13 000 tot 20 000 bp en k-meer-lengte van 21 tot 39 bp stapsgewys verstel. Lesinglengte is teen 151 bp en insetselgrootte is teen 390 bp gestel, met alle ander monteringsparameters volgens die verstekstellings. Uiteindelik is die langste versirkelbare grepies geselekteer om die gemonteerde mitochondriese volgorders van die twee eksemplare van *P. xenopodis* te verteenwoordig.

Om moontlike gapings in dekking of wanmonteerde streke uit te wys is die twee stelle besnoeide lesings weer op hulle onderskeie gemonteerde grepies in Geneious Prime *weergawe* 2021.0.3 (www.geneious.com) gepas deur gebruik te maak van die sagteware se ingeboude passingsalgoritme teen middelmatige gevoeligheid.

Versirkeling van die monteerde grepies is met die hand in Geneious Prime uitgevoer deur na gedupliseerde streke op die 5' en 3'-punte op die monteerde grepies te soek.

Die samestelling van die twee volledige mitochondriese sirkelvolgordes is deur hul GC-inhoud en die GC en AT skeefheidsindekse versyfer (Perna & Kocher, 1995). Die skeefheidindekse is met die formules $[(G - C)/(G + C)]$ en $[(A - T)/(A + T)]$, afgelei van die nukleotiedsamestelling van die koderende string van elke mitochondriese volgorde vanaf Geneious Prime, bereken.

Annotasie van die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* is deur die aanlynbedieners van Arwen *weergawe* 1.2 (Laslett & Canbäck, 2008), MITOS1 (Bernt *et al.*, 2013), MITOS2 (*beta* weergawe) and tRNAscan-SE *weergawe* 2.0 (Chan & Lowe, 2019; Lowe & Chan, 2016) aan die gang gesit. Die voorstelle vir proteïenkoderende gene (PCG'e) is met die oop leesrame wat in Geneious Prime onder verstekstellings en die eginoderm en platwurm mitochondriese kode (tabel 9) verkry is, vergelyk. Die voorlopig uitgekende PCG'e en tRNA- en rRNA-gene is verder verfyn gebaseer hulle belyning met ander poliopistokotileër mitochondriese gene wat op GenBank beskikbaar was (Tabel 7.1) en die beginsels van minimumgeenoorvleueling en maksimummitogenoomdigtheid.

Volgordebelynings vir mitogenoomannotasie, berekening van nukleotiedverskeidenheid en filogenetiese analises is almal op gelyke wyse uitgevoer, maar met verskillende stelle taksa. Kodongebaseerde belyning vir al die verkrygde PCG'e is onder die eginoderm en platwurm mitochondriese genetiese kode (tabel 9) met behulp van die Clustal Omega-algoritme (Sievers & Higgins, 2017) in Geneious Prime uitgevoer. Die rRNA-gene is aanlyn (Katoh *et al.*, 2017) deur MAFFT *weergawe* 7 (Katoh & Standley, 2013) in die Q-INS-i-modus (Katoh & Toh, 2008) bepaal, wat die sekondêre struktuur van die RNA volgens die McCaskill-roetine van die *ViennaRNA*-pakket (Hofacker *et al.*, 2002) en MXSCARNA (Tabei *et al.*, 2008) in ag neem. Die res van die mitogenoom, insluitend die tRNA-gene en niekoderende streke (NCR'e), is deur die Clustal Omega-algoritme (Sievers & Higgins, 2017) in Geneious Prime belyn.

Tabel 7.1: Poliopistokotileërspesies, hulle beskikbare mitochondriese gene, ooreenstemmende GenBank-toetredingsnommers en verbonde publikasies wat gebruik is om gene vir mitogenoomannotasie en filogenetiese analises te belyn.

Spesie	Beskikbare gene	Toetredingsnommer
Microcotylidae		
Microcotyle sebastis Goto, 1894	Alle	DQ412044 (Park *et al.*, 2007)
Polylabris halichoeres Wang *et* Zhang, 1998	Alle	JF505509 (Zhang *et al.*, 2011)
Polylabroides guangdongensis Zhang *et* Yang, 2000	Alle behalwe *COX3*, *NAD6*, $tRNA^{Leu1\ \&\ Lys}$	JQ038230 (Zhang *et al.*, ongepubl.)
Mazocraeidae		
Neomazocraes dorosomatis (Yamaguti, 1938) Price, 1943	Alle behalwe *COX3*, *NAD6*, $tRNA^{Leu1,\ Leu2\ \&\ Lys}$	JQ038229 (Zhang *et al.*, ongepubl.)
Chauhaneidae		
Pseudochauhanea macrorchis Lin, Liu *et* Zhang, 2001	Alle	JN592039 (Zhang *et al.*, 2012)
Diclidophoridae		
Heterobothrium okamotoi Ogawa, 1991	Alle	MK948930 (Li *et al.*, 2019)
Diplozoidae		
Eudiplozoon Khotenovsky, 1984, sp.	Alle	MG458328 (Zhang *et al.*, 2018b)
Paradiplozoon opsariichthydis (Jiang, Wu *et* Wang, 1984) Jiang, Wu *et* Wang, 1989	Alle	MG458327 (Zhang *et al.*, 2018b)
Sindiplozoon Khotenovsky, 1981, sp.	Alle	MG458326 (Zhang *et al.*, 2018b)
Polystomatidae		
Diplorchis hangzhouensis Zhang *et* Long, 1987	Alle behalwe *NAD2*	JQ038227 (Zhang *et al.*, ongepubl.)

In die geval van die tRNA-gene is die voorspelde sekondêre strukture van MiTFi (Jühling *et al.*, 2012), Arwen (Laslett & Canbäck, 2008) en tRNAscan-SE (Chan & Lowe, 2019; Lowe & Chan, 2016) ook in ag geneem. Ons het voorkeur gegee aan die voorgestelde tRNA-gene waarvan die sekondêre struktuur 'n 7 bp-akseptorarm en 'n lae minimum vrye energievlak (MFE) gehad het. Vrye energie van die sekondêre strukture is aanlyn met RNAeval (Gruber *et al.*, 2008) bereken, 'n hulpmiddel in die *ViennaRNA*-pakket *weergawe* 2.4 (Lorenz *et al.*, 2011), teen 20 °C, die optimale temperatuur vir die eierontwikkeling van *P. xenopodis* (Jackson & Tinsley, 1988). Die intraspesifieke polimorfiese liggings in die mitochondriese tRNA-gene van *P. xenopodis*, soos uitgewys via die Clustal Omega-belyning, is by die uitbeeldings van die sekondêre struktuur se intraspesifieke verskeidenheid, gevoeg.

Die geannoteerde mitogenoom van *P. xenopodis*, tesame met sy GC-inhoud, is in OrganellarGenomeDRAW uitgebeeld (Greiner *et al.*, 2019). Die relatiewe sinonieme kodonverbruik (RSCU) oor die 12 PCG'e in die twee variante van die mitogenoom van *P. xenopodis* is op

die CAIcal webbediener (http://genomes.urv.es/CAIcal; Puigbò *et al.*, 2008) volgens Sharp *et al.* (1986) bereken. Kodonfrekwensies en aminosuurgebruikstatistiek is in Geneious Prime afgelei.

Op grond van dieselfde beginsels as dié wat hierbo uiteengesit is, het ons die beskikbare geannoteerde poliopistokotileërmitogenome (Tabel 7.1) ondersoek om die oorspronklike annotasies te verbeter. Die daaropvolgende filogenetiese analises is op ons voorgestelde herannotasies gebaseer.

Belyning is op al die gene en NCR'e in die twee volgordes van die mitogenoom van *P. xenopodis* uitgevoer volgens die bogenoemde metodes. Die apart belynde gedeeltes, insluitend die PCG'e, rRNA en tRNA-gene en NCR'e, is in Geneious Prime in die volgorde waarin hulle in die mitogenoom verskyn het, aaneengeskakel. Die gevolglike belyning, 'n totaal van 13 768 bp, is gebruik om veranderlikheid in die *P. xenopodis*-mitogenoom deur 'n skuifvensteranalise van nukleotiedverskeidenheid (π) te visualiseer. Die analise is met 'n venstergrootte van 300 bp en 'n stapgrootte van 10 bp in DnaSP *weergawe* 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) uitgevoer.

Die mees spaarsame mitochondriese genetiese herrangskikkings in die Polyopisthocotylea, tesame met paarsgewyse vergelykings van die mitochondriese geenorde, is met die CREx-aanlynbediener (Bernt *et al.*, 2007) uitgepluis. Die gemeenskaplike intervalparameter is vir die afstandmeting toegepas. Alle beskikbare poliopistokotileërmitogenome, buiten dié van *Neomazocraes dorosomatis* (Yamaguti, 1938) Price, 1943 en *Polylabroides guangdongensis* Zhang *et* Yang, 2000 wat meer as een weggelate geen gehad het, is in die analise gebruik (Tabel 7.1).

Belynings vir die filogenetiese analises is vir al die beskikbare poliopistokotileërmitogenome op GenBank uitgevoer (Tabel 7.1). Die mitogenoomvolgordes van die visparasiterende monopistokotileërs *Paratetraonchoides inermis* Bychowsky, Gussev *et* Nagibina, 1965 (Monogenea: Tetraonchoidae) (toetredingsnommer KY856918; Zhang *et al.*, 2017) en *Dactylogyrus lamellatus* Achmerov, 1952 (Monogenea: Dactylodyridae) (toetredingsnommer KR871673; Zhang *et al.*, 2018c) is as buitegroepe ingesluit. Geenbelynings is apart, soos hierbo uiteengesit, op 12 PCG'e en op die rRNA-gene (*rrnS* en *rrnL*) uitgevoer. Daarna is al 14 geenbelynings in Geneious Prime aaneengeskakel.

Die aaneengeskakelde belyning is aanvanklik aan die hand van gene, asook kodonposisies in die geval van PCG'e, opgedeel. Die optimale modelle van molekulêre evolusies vir die opdelings is met die ModelFinder seleksieroetine (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), soos uitgvoer in IQ-TREE *weergawe* 2.1.2 (Minh *et al.*, 2020), gekies, wat die FreeRate heterogeneïteitsmodel gedurende modelseleksie toegepas het (Soubrier *et al.*, 2012). Die aanvanklike verdelings is toe sekwensieel saamgesmelt (Chernomor *et al.*, 2016) totdat modelpassing, soos met die Bayes-Inligtingskriterium (BIC) beoordeel, nie meer verbeter het nie. Die gevolglike optimale opdelingskema en mees geskikte evolusionêre modelle

Tabel 7.2: Beste opdelingskema vir die aaneengeskakelde belyning van 14 mitochondriese gene vanaf 14 monogeneërplatwurmspesies, geëvalueer volgens die Bayes-Inligtingskriterium. Die optimale evolusionêre modelle vir elke opdeling, volgens die uitsette van die ModelFinder-seleksieroetine wat in IQ-TREE2 (Minh *et al.*, 2020) uitgevoer is met sekwensieëe samesmelting (Chernomor *et al.*, 2016), word weergegee soos dit in die maksimumaanneemlikheidsanalise (ML) toegepas is, tesame met die aangepasde nukleotiedvervangingsmodelle wat vir die Bayes-inferensie (BI) gebruik is.

Opdeling	Model vir ML	Model vir BI
rrnS, *rrnL*	TPM3 + F + I + G4	`nst = 6 rates = invgamma`
1ste kodonposiies van *NAD4–6* en *NAD4L*	HKY + F + R3	`nst = 2 rates = equal`
1ste kodonposisies van *ATP6*, *COX3*, *cytb*, *NAD1* en *NAD3*; 2de van *ATP6*	HKY + F + G4	`nst = 2 rates = gamma`
1ste kodonposisies van *COX1*; 2de van *COX1*, *COX3*, *cytb*, *NAD1* en *NAD4L*	GTR + F + I + G4	`nst = 6 rates = invgamma`
1ste kodonposisies van *COX2* en *NAD2*; 2de of *COX2* en *NAD2–6*	GTR + F + I + G4	`nst = 6 rates = invgamma`
3de kodonposisies van *ATP6*, *COX1–3*, *cytb*, *NAD1–6* en *NAD4L*	TIM2 + F + R3	`nst = 6 rates = equal`

DNA-modelle: HKY (Hasegawa *et al.*, 1985), TPM ("3-parameter model") (Kimura, 1981), TIM ("transitional model") (Posada, 2003) en GTR ("general time-reversible model") (Tavaré, 1986); Koersongelyksoortigheid oor liggings: F (empiriese basisfrekwensies), G (diskrete Gamma-model) (Yang, 1994), I (toelating van 'n proporsie van invariante liggings) (Gu *et al.*, 1995) en R (FreeRate-model) (Soubrier *et al.*, 2012)

vir elke onderafdeling is in die opeenvolgende filogenetiese analises vasgestel (Tabel 7.2). Vir boomherkonstruksie is beide die maksimumaanneemlikheidsanalise (ML) en die Bayes-inferensie van filogenie (BI) uitgevoer om sodoende die vertroue in die gevolglike topologie te verhoog.

Die ML-filogenie is onder die ses opdelings wat deur die ModelFinder-seleksieroetine voorgestel is, uitgevoer (Tabel 7.2). Gedurende die analise is die opdelings aan hulle randte ontkoppel. Die analises is in IQ-TREE *weergawe* 2.1.2 (Minh *et al.*, 2020) uitgevoer, met die assessering van taksteun deur ultravinnige skoenlussteekproefneming (UFboot2; Hoang *et al.*, 2018) en die Shimodaira-Hasegawa benaderde aanneemlikheidsverhoudingstoets (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010), elk met 10 000 replikate.

Die BI is in MrBayes *weergawe* 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) in XSEDE op die CIPRES Science Gateway *weergawe* 3.3 (Miller *et al.*, 2010) van stapel gestuur. Die vervangingsmodelle wat in MrBayes geïmplementeer is, is aangepas van ModelFinder se keuses as die volgende mees komplekse model onder die BIC na aanleiding van vervangingskoerse wat in MrBayes beskikbaar is (Tabel 7.2). *A posteriori*-waarskynlikhede is met vier verskillende Metropolis-gekoppelde Markov-kettings oor 10 000 000 generasies, met steekproefneming van die Markom-kettings elke 1 000ste generasie, bepaal. Die eertse kwart van die monsters is verwerp. Alle parameterberamings is ontkoppel vir die opdelings. Stasionariteit van die Markov-kettings is bereik, soos deur 'n 0.001 afwyking van die verdeelde

frekwensies aangedui is, asook deur ’n potensiële skaalreduksiefaktor wat konvergeer tot 1 en deur die afwesigheid van ’n tendens in die stipping van die log-waarskynlikhede teenoor generasies.

Die verkrygde topologieë is ten opsigte van die monopistokotileërbuitegroepe, *Da. lamellatus* and *Pt. inermis*, in FigTree *weergawe* 1.4.4 (Rambaut, 2018) gewortel.

7.3 Resultate

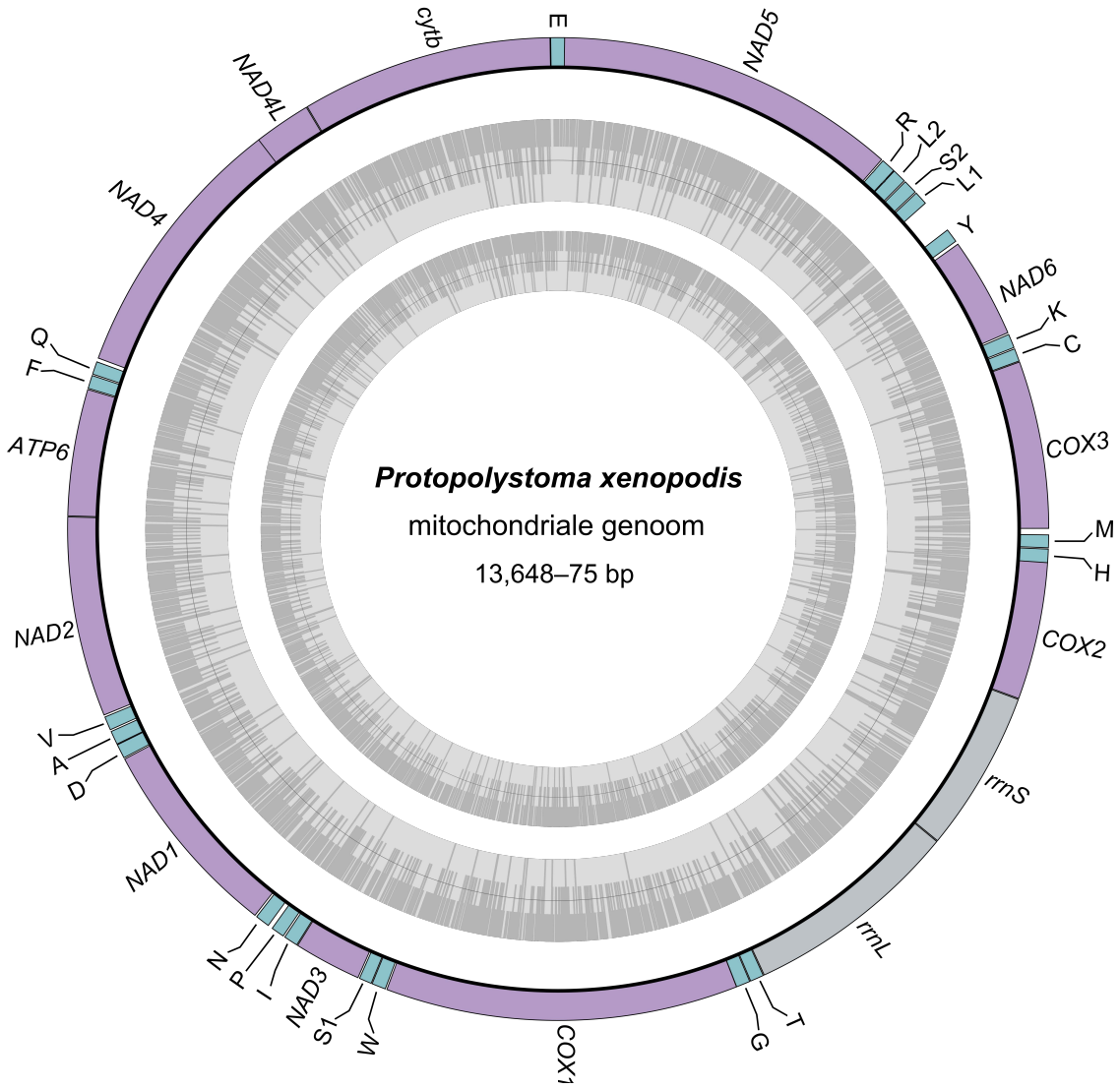
Twee volledige mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* is gemonteer (Figuur 7.1). Die voorlopige annotasie van *D. hangzhouensis* is verbeter. Daarby is sekere veranderinge tot die mitogenome van *Microcotyle sebastis* Goto, 1894, *N. dorosomatis*, *Pseudochauhanea macrorchis* Lin, Lui *et* Zhang, 2001 en *Sindiplozoon* Khotenovsky, 1981, sp. voorgestel.

7.3.1 Volgordebepaling en montering

Die monteerde mitogenoomvolgorde van die eerste eksemplaar van *P. xenopodis* is vanaf 86 588 420 rou lesings (59 466 598 gepaarde en 10 846 698 ongepaarde lesings) wat deur Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) besnoei is, met ’n k-meer-lengte van 37 bp en ’n verwagte lengte van die volgorde tussen 15 000 en 20 000 bp, verkry. Die gemiddelde dekking was 611$\times$ en 35 912 uit ’n totaal van 39 202 788 besnoeide lesings (0.092%) is monteer tot ’n enkele greep met ’n lengte van 20 019 bp.

In die geval van die gemonteerde volgorde van die tweede eksemplaar is 70 980 916 rou lesings (70 256 538 gepaarde en 353 680 ongepaarde lesings) besnoei deur fastp (Chen *et al.*, 2018) en k-meer-lengte was op 39 bp gestel met ’n verwagte genoomgrootte van tussen 13 000 and 16 000 bp. Montering het vier oorvleuelende grepe met lengtes 1 518, 4 945, 5 051 en 9 867 bp tot gevolg gehad, wat bely het op ’n kontinue volgorde van 15 335 bp te vorm. Gemiddelde dekking was 3927$\times$, met ’n totaal van 301 606 uit 54 221 376 besnoeide lesings (0.556%) wat aan die finale montering deelgeneem het.

Herpassing van die lesings het geen areas van lae dekking of wanmontering in enige van die twee volgordes aangewys nie. Versirkeling het die lengte van die NCR tussen *NAD5* en *NAD6* merkbaar verkort, insluitings die uitskakeling van een of selfs twee ente van tandemherhalings van die voorlopige monterings. Dit het met die voorlopige mitogenoom van *D. hangzhouensis* ooreengestem, wat ook ’n betreklike kort NCR tussen hierdie twee gene bevat het wat ook geen tandemherhalings ingesluit het nie. Die lineêre voorlopige mitogenoom van *D. hangzhouensis* is deur belyning met die verkrygde mitogenoom van *P. xenopodis* versirkel.



Figuur 7.1: Mitochondriese genoom van die polistomatiedplatwurm *Protopolystoma xenopodis*, soos voorgestel deur OGDraw. GC-inhoud van die eerste eksemplaar word in die binnering vertoon, GC-inhoud van die tweede eksemplaar in die middelste ring en geenrangskikking in die buitrring. Eenletterafkortings word vir die oordraer-RNA-gene gebruik.

Die volledige sirkelmitogenoom van *P. xenopodis* is tussen 13 648 and 13 675 bp lank, terwyl die voorlopige sirkelmitogenoom van *D. hangzhouensis* langer is teen 13 918 bp. Daarby is die mitogenome van beide polistomatiedspesies AT-ryk met A $<$ T en G $>$ C op die koderende string (Tabel 7.3).

7.3.2 Annotasie

Ons het die plasings van al 36 verwagte gene in die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* suksesvol bepaal (Tabel 7.4). Die gene kon grotendeels geannoteer word op grond van die sagtewarevoorspellings en geenbelynings. Nietemin is daar ’n paar gevalle

Tabel 7.3: GC-inhoud en samestellingsasimmetrie in die twee nuutmonteerde mitogenoomvolgordes van *Protopolystoma xenopodis* en die hergeannoteerde konsepmitogenoom van *Diplorchis hangzhouensis*. Skeefheidswaardes is met die hand volgens die volgende formules bereken: [(G - C)/(G + C)] en [(A - T)/(A + T)].

	P. xenopodis eksemplaar 1	*P. xenopodis* eksemplaar 2	*D. hangzhouensis*
GC%	31.8	30.0	27.9
GC-skeefheid	0.354	0.372	0.479
AT-skeefheid	-0.276	-0.277	-0.377

waar ons spesiale melding moet maak van die finale annotasiebsluit.

Die stopkodons van ’n aantal PCG’e het oënskynlik tussen die twee volgordes van die mitogenoom van *P. xenopodis* verskil. In die *COX1*, *NAD1*, *NAD3* en *NAD4*-gene was die stopkodons onderskeidelik T(CA/AA), T(CG/CA), TA(G/A) en TA(G/A). Hierdie is as afgeknotte stopkodons geannoteer maar mag dalk gevalle van bevolkingspeilheterosigositeit voorstel as ons sou aanneem dat hierdie volledige eerder as verkorte stopkodons is.

’n Raamskuifindel van 2 bp by die 3’ punt van die *COX2*-geen in een van die volgordes het tot gevolg gehad dat daar ’n stopkodonposisie 1 aa vroeër as in die ander volgorde opgeduik het. Hierdie het tot ’n intraspesifieke lengteverskil (619 teenoor 624) en ’n veranderlike stopposisie (619 teenoor 622) en -kodon (T(GG) teenoor TAA) in *COX2* gelei. In die belyning van 116 469 besnoeide lesings met die volgorde van die langer variant van die *COX2*-geen bevat het, bevat minder as 2% van die deelnemende lesings ’n 2 bp-invoeging by hierdie punt wat nie in die finale montering ingesluit is nie. Ons het aangeneem dat dié ’n volgordebepalingsfout was en nie ’n aanduiding dat hierdie mitgogenoom ook die ekstra 2 bp mag bevat nie.

Ons het ’n afgeknotte T-stopkodon voorgestel vir die *COX3*-geen in *P. xenopodis*, eerder as die niegebruiklike TTA wat by beide volgordes in hierdie posisie teenwoordig was, aangesien hierdie keuse die oorvleueling met die volgende *trnC* tot niet gemaak het.

Ons het ’n gebruiklike TAG-inisiasiekodon vir die *NAD5*-geen in *P. xenopodis* oor ’n afgeknotte T(TC)-stopkodon gekies wat 9 bp stroomop van hierdie posisie gelê het ingevolge die geen se belyning met daardie van die ander poliopistokotileërs. Hierdie terminasieposisie het in ’n oorvleueling van 10 bp met die daaropvolgende *trnE* bewerkstellig, die lankste ent van geenoorvleueling in hierdie mitogenoom behalwe die verwagte oorvleueling van 40 bp tussen *NAD4L* en *NAD4*.

In die geval van *rrnL* in die mitogenoom van *P. xenopodis*, was die sagtewarevoorspellings duidelik onakkuraat as hulle met dieselfde geen in ander poliopistokotileërs belyn is. Nietemin het die nukleotiedvolgordes tussen die 3’-punt van *trnT* en die 5’-punt van *rrnS* goed met die geen in ander poliopistokotileërs belyn wat ons in staat gestel het om hierdie geen te annoteer.

Tabel 7.4: Plasing van die gene en niekoderende gebiede in die mitochondriese genoom van *Protopolystoma xenopodis*. Kodons is die inisiasie- en stopkodon óf die antikodon.

	P. xenopodis eksemplaar 1		*P. xenopodis* eksemplaar 2	
Gene	Posisie (Lengte)	Kodon	Posisie (Lengte)	Kodon
COX3	1–757 (757)	ATG & T(TA)	1–754 (754)	ATG & T(TA)
trnC	758–819 (62)	GCA	755–816 (62)	GCA
trnK	822–888 (67)	CTT	824–890 (67)	CTT
NAD6	893–1348 (456)	ATG & TAG	895–1350 (456)	ATG & TAG
trnY	1360–1426 (67)	GTA	1353–1419 (67)	GTA
trnL1	1576–1640 (65)	TAG	1570–1633 (64)	TAG
trnS1	1643–1710 (68)	TGA	1636–1705 (70)	TGA
trnL2	1713–1778 (66)	TAA	1707–1772 (66)	TAA
trnR	1778–1846 (69)	TCG	1772–1841 (70)	TCG
NAD5	1850–3397 (1548)	GTG & TAG	1845–3392 (1548)	GTG & TAG
trnE	3388–3454 (67)	TTC	3383–3451 (69)	TTC
cytb	3453–4589 (1137)	GTG & TAG	3450–4586 (1137)	GTG & TAG
NAD4L	4590–4850 (261)	GTG & TAG	4587–4847 (261)	GTG & TAG
NAD4	4811–6066 (1256)	GTG & TA(A)	4808–6057 (1250)	ATG & TA(G)
trnQ	6080–6141 (62)	TTG	6069–6129 (61)	TTG
trnF	6144–6207 (64)	GAA	6132–6194 (63)	GAA
ATP6	6209–6781 (573)	ATG & TAG	6195–6767 (573)	ATG & TAG
NAD2	6782–7684 (903)	GTG & TAG	6768–7670 (903)	GTG & TAG
trnV	7690–7755 (66)	TAC	7676–7740 (65)	TAC
trnA	7760–7825 (66)	TGC	7744–7807 (64)	TGC
trnD	7825–7893 (69)	GTC	7807–7875 (69)	GTC
NAD1	7896–8808 (913)	ATG & T(CG)	7878–8790 (913)	ATG & T(CA)
trnN	8814–8882 (69)	GTT	8796–8864 (69)	GTT
trnP	8900–8963 (64)	TGG	8875–8937 (63)	TGG
trnI	8968–9035 (68)	GAT	8942–9008 (67)	GAT
NAD3	9036–9343 (308)	GTG & TA(A)	9009–9319 (311)	GTG & TA(G)
trnS1	9347–9407 (61)	GCT	9324–9382 (59)	GCT
trnW	9408–9474 (67)	TCA	9384–9450 (67)	TCA
COX1	9478–11068 (1591)	ATG & T(CA)	9454–11044 (1591)	ATG & T(AA)
trnG	11065–11131 (67)	TCC	11037–11103 (67)	TCC
trnT	11132–11197 (66)	TGT	11104–11169 (66)	TGT
rrnL	11198–12177 (980)		11170-12151 (982)	
rrnS	12178–12906 (729)		12152–12875 (724)	
COX2	12907–13530 (624)	GTG & TAA	12876–13494 (619)	GTG & T(GG)
trnH	13524–13588 (65)	GTG	13495–13560 (66)	GTG
trnM	13590–13651 (62)	CAT	13563–13624 (62)	CAT

Daar is slegs een geval waar ons annotasie van ’n tRNA-geen van die sagtewarevoorspellings afgewyk het. Die voorspellings vir *trnR* in die eerste volgorde van *P. xenopodis* het almal van mekaar in lengte verskil. Boonop het geeneen van hierdie ’n 7 bp-akseptorarm voorspel nie. Hierdie voorspellings was ook korter as die voorgestelde *trnR*-geen in die tweede volgorde van *P. xenopodis*. Ons het 1 bp aan elke ent van die langste voorspelling (die Arwen-voorspelling) van die geen in die eerste volgorde gevoeg om die geen met

Tabel 7.5: Voorgestelde veranderinge aan die geenposisie, lengte en inisiasie-, stop en antikodons in sekere van die poliopistokotileërmitogenome wat op GenBank beskikbaar is. Gene wat nie geannoteer kon word nie, word met 'n.v.t.' aangedui.

Spesie	Gene	Posisie (Lengte)	Inisiasie- & Stop-/Antikodon
Diplorchis hangzhouensis	*NAD6*	1009–1458 (450)	GTT & TAG
	NAD4L	4823–5063 (261)	TTG & TAA
	ATP6	6446–7016 (571)	ATG & TAG
	NAD2	n/a	n.v.t.
	trnV	7898–7964 (67)	TAC
	trnA	7965–8033 (69)	TGC
	trnS1	9563–19620 (58)	GCT
Microcotyle sebastis	*NAD4*	3008–4243 (1236)	ATG & TAA
Neomazocraes dorosomatis	*NAD5*	185–1729 (1545)	TTG & TAA
	COX1	7797–9380 (1584)	TTG & TAA
Pseudochauhanea macrorchis	*NAD4*	6154–7278 (1125)	ATG & TAG
Sindiplozoon sp.	*NAD5*	3032–4559 (1528)	TTG & T(AT)
	ATP6	7535–8140 (606)	TTG & TAG
	NAD2	8143–9033 (891)	TTG & TAG
	NAD3	10411–10698 (288)	TTG & TAG
	COX2	14448–15077 (630)	TTG & TAG

dieseldfe geen in die tweede volgorde te belyn. Dit het die akseptorarm toegelaat op 7 bp lank te wees en het 'n weglaatbaar klein toename in die vrye energievlak van die geen ($+$ 0.19 kcal/mol) tot gevolg gehad.

Benewens ons annotasie van die mitogenoom van *P. xenopodis* doen ons sewe veranderinge aan die mitogenoomannotasie van *D. hangzhouensis* aan die hand (Tabel 7.5), waarvan daar 'n voorlopige mitogenoom op GenBank beskikbaar is (Zhang *et al*., ongepubl.). Op basis van die sagtewarevoorseggings en die belyning met dieselfde gene in ander poliopistokotileërs, stel ons voor dat die inisiasie van die geen vir *ATP6* 24 bp stroomaf van die oorspronklike voorspelde posisie na 'n ATG inisiasiekodon skuif, *NAD4L* 7 bp stroomop na 'n TTG inisiasiekodon en *NAD6* 42 bp stroomop na 'n niegebruiklike GTT beginkodon. Twee tRNA-gene wat in die oorspronklike annotasie uitgelaat is, naamlik dié vir *trnA* en *trnV*, is bygevoeg aan die hand van die posisies wat deur die tRNA-annotasiesagteware aangebied is. 'n Ander tRNA-geen, die ene vir *trnS1*, is 6 bp stroomaf van sy oorspronklike plasing geskuif. Laastens bevraagteken ons die annotasie van die *NAD2*-geen, alhoewel ons daarin faal om 'n beter annotasie te verskaf. Nóg die sagtewarevoorstelle, nóg enige van die belynings van hierdie streek van die mitogenoom met die ortoloë streke in die ander poliopistokotileërs se mitogenome nie, kon die insisiasie- en stopkodons or die korrekte leesraam vir hierdie geen sonder twyfel weergee nie. Dus trek ons die *NAD2*-geen, soos geannoteer deur Zhang *et al.* (ongepubl.), in twyfel.

Daarby is etlike annotasiewysigings vir die ander poliopistokotileërmitogenome voorgestel, op grond van dieselde beginsels as dié wat hierbo geskets is (Tabel 7.5). Ons doen

aan die hand dat die inisiasiekodon van *NAD4* in *M. sebastis* 36 bp stroomop na 'n ATG-inisiasiekodon moet skuif (in teëstelling met die annotasie deur Park *et al.*, 2007). Dit bewerkstellig 'n 40 bp-oorvleueling tussen *NAD4L* en *NAD4*, wat met naverwantes ooreenstem. Die toevoeging van 60 bp tot die 5' end van die *COX1*-geen in *N. dorosomatis* belyn sy insisiasieposisie met dié van die ander poliopistokotileërs en verminder die gaping tussen hierdie geen en die voorgaande *trnW*. Tewens het die skuif van die insisiasieposisie van die *NAD5*-geen van hierdie spesie met 135 bp stroomop ook belyning grootliks verbeter. In die geval van *Ps. macrorchis* het 'n verskuiwing van die insisiasieposisie met 9 bp stroomaf 'n verbeterde belyning van sy *NAD4*-geen met naverwantes en 'n meer tipiese oorvleueling van 40 bp met die *NAD4L*-geen tot stand gebring (in teëstelling met die annotasie deur Zhang *et al.*, 2012). In die mitogenoom van *Sindiplozoon* sp. het ons voorgestel dat die inisiasieposisies van die *ATP6*-geen, die *COX2*-geen en die *NAD5*-geen onderskeidelik 30 en 39 bp stroomop en 30 bp stroomaf, van die oorspronklike plasings af wegskuif (in teëstelling met die annotasie deur Zhang *et al.*, 2018b). In die geval van die inisiasiekodon van die *NAD2*-geen verwerp ons Zhang *et al.* (2018b) se werkshipotese van 'n TTG-inisiasiekodon en stel die naburige TTG-beginkodon wat 3 bp stroomop is voor om die inisiasieposisie nader aan die 3' end van die *ATP6*-geen te bring. Insgelyks het ons die voorlopig toegekende inisiasieposisie van die *NAD3*-geen verwerp en stel ons 'n inisiasiekon 9 bp stroomop van hierdie punt voor. Ter afsluiting is ons eens met die voorlopig toegekende inisiasiekodons en -posisies van die *NAD5*-geen in *Eudiplozoon* Khotenovsky, 1984, sp., die *ATP6* en *NAD2*-gene in *Paradiplozoon opsariichthydis* (Jiang, Wu *et* Wang,1984) Jiang, Wu *et* Wang, 1989, die *COX1*, *cytb* en *NAD1*-gene in *Sindiplozoon* sp. (in ooreenkoms met Zhang *et al.*, 2018b).

7.3.3 Mitogenoomargitektuur, geeninhoud en intraspesifieke variasie

Die mitogenoom van *P. xenopodis* kodeer al 36 gene wat van die neodermaatmitogenoom verwag kon word, naamlik 12 PCG'e, 22 tRNA-gene en twee rRNA-gene (Figuur 7.1; Tabel 7.4). Alle gene was vanaf dieselfde string getranskribeer.

Die mitogenoom was hoogs kompak, met basisse wat nie aan kodering deelneem nie wat slegs 1.80–1.87% van die totale lengte van die mitogenoom van *P. xenopodis* uitmaak. Die mitogenoom van *P. xenopodis* het 20 NCR'e in totaal bevat, wat strek van 1 tot 150 bp lank met 'n gemiddelde lengte van 13 bp. Die langste NCR (149–150 bp in totaal) het tussen die *trnY* en die *trnL1*-gene gelê en het stelle van nukleotiedherhalings ($A_{4–5}$, $C_{6–12}$, $G_{7–10}$, $T_{4–5}$) asook 'n TA-ryke streek ($TA_{10–14}$) bevat. Paarsgewyse identiteit van hierdie streek tussen die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* was laag teen 65.8%. MITOS2 (*beta*-weergawe) het voorgelê dat hierdie streek moontlik die oorsprong van replikasie in die mitogenoom van beide eksemplare kan wees. Volgens die RNAfold-algoritme (Gruber *et al.*, 2008) in die *ViennaRNA*-pakket *weergawe* 2.4 (Lorenz *et al.*, 2011) is hierdie NCR'e in staat daartoe om sekondêre stamlusstrukture te vorm. Geen strekke van

tandemherhalings kon in enige van die twee volgordes van *P. xenopodis* uitgeken word nie. Daarby het geeneen van die voorspellingsagtewareprogramme die aanwesigheid van tRNA-agtige gene in hierdie streek aangedui nie.

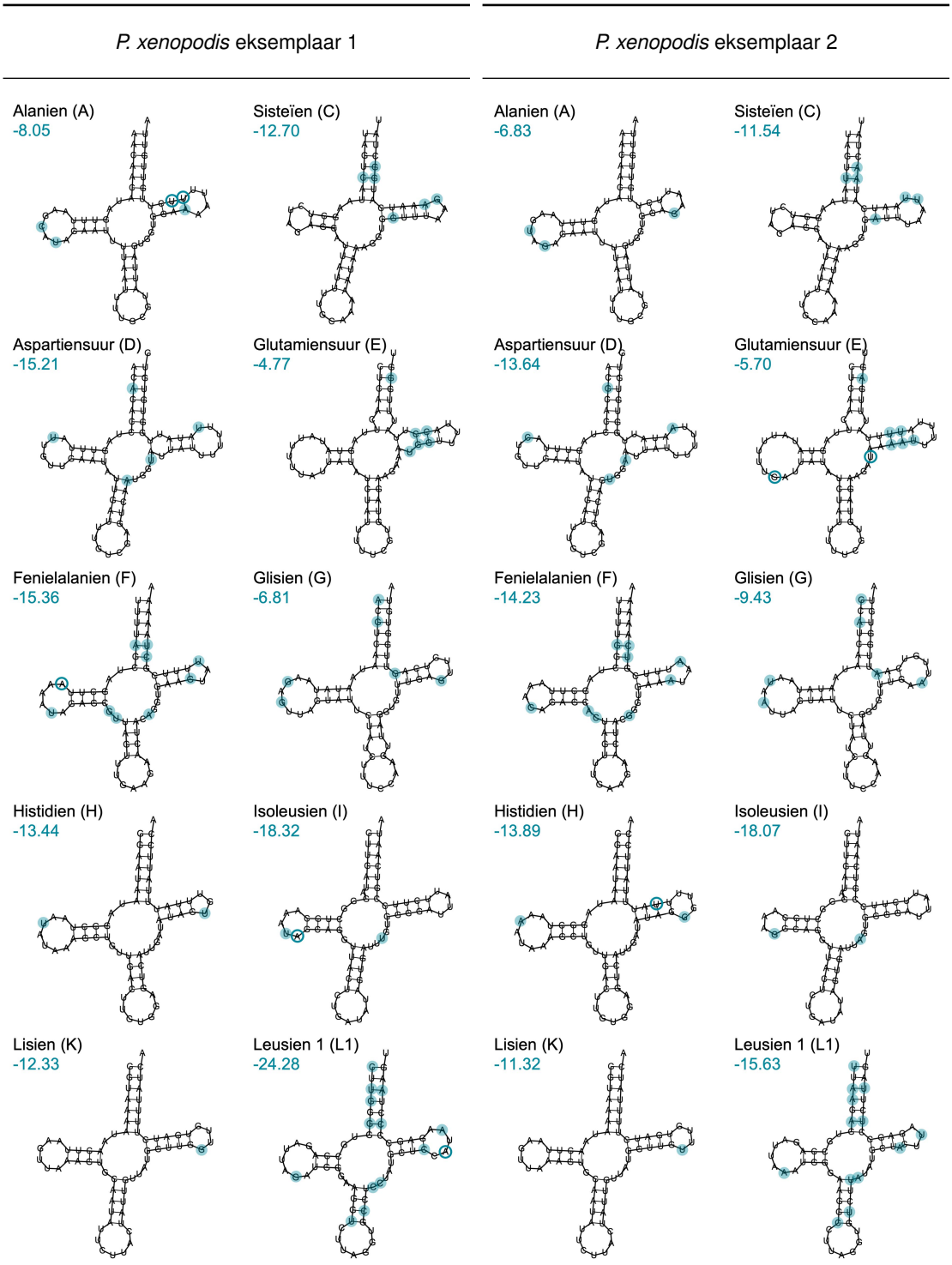
Die *NAD4L*-geen het die enigste geval voorgestel waar een PCG met 'n ander oorvleuel, naamlik *NAD4*. Daar was drie gevalle van vername oorvleueling tussen 'n PCG en die daaropvolgende tRNA-geen in die mitogenoom van *P. xenopodis*, met name *COX1–trnG* (4–8 bp), *COX2–trnH* (0–7 bp) en *NAD5–trnE* (10 bp). Boonop was daar verskeie gevalle van tRNA-gene wat met mekaar, of met PCG'e oorvleuel het met een of twee basisse.

Die PCG'e is in die orde *COX3–NAD6–NAD5–cytb–NAD4L–NAD4–ATP6–NAD2–NAD1-–NAD3–COX1–COX2* rangskik (Figuur 7.1). 'n Totaal van 10 276–10 287 bp het aan proteïenkodering deelgeneem, wat 75.2–75.3% van die mitogenoom beslaan. Die PCG'e het op 'n gemiddeld vir 286 aminosure kodeer en het van 261 (86 aa) tot 1 591 (530 aa) bp in lengte gestrek. Intraspesifieke lengteverskille in PCG'e is tussen die eerste en tweede mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* opgemerk. Lengteverskille van een of twee aminosure is in die *COX1* (1 aa), *COX2* (1 aa), *COX3* (1 aa), *NAD3* (1 aa) en die *NAD4*-gene (2 aa) gevind. In *COX2* het hierdie lengteverskil 'n veranderlike stopposisies vir die geen tot gevolg gehad.

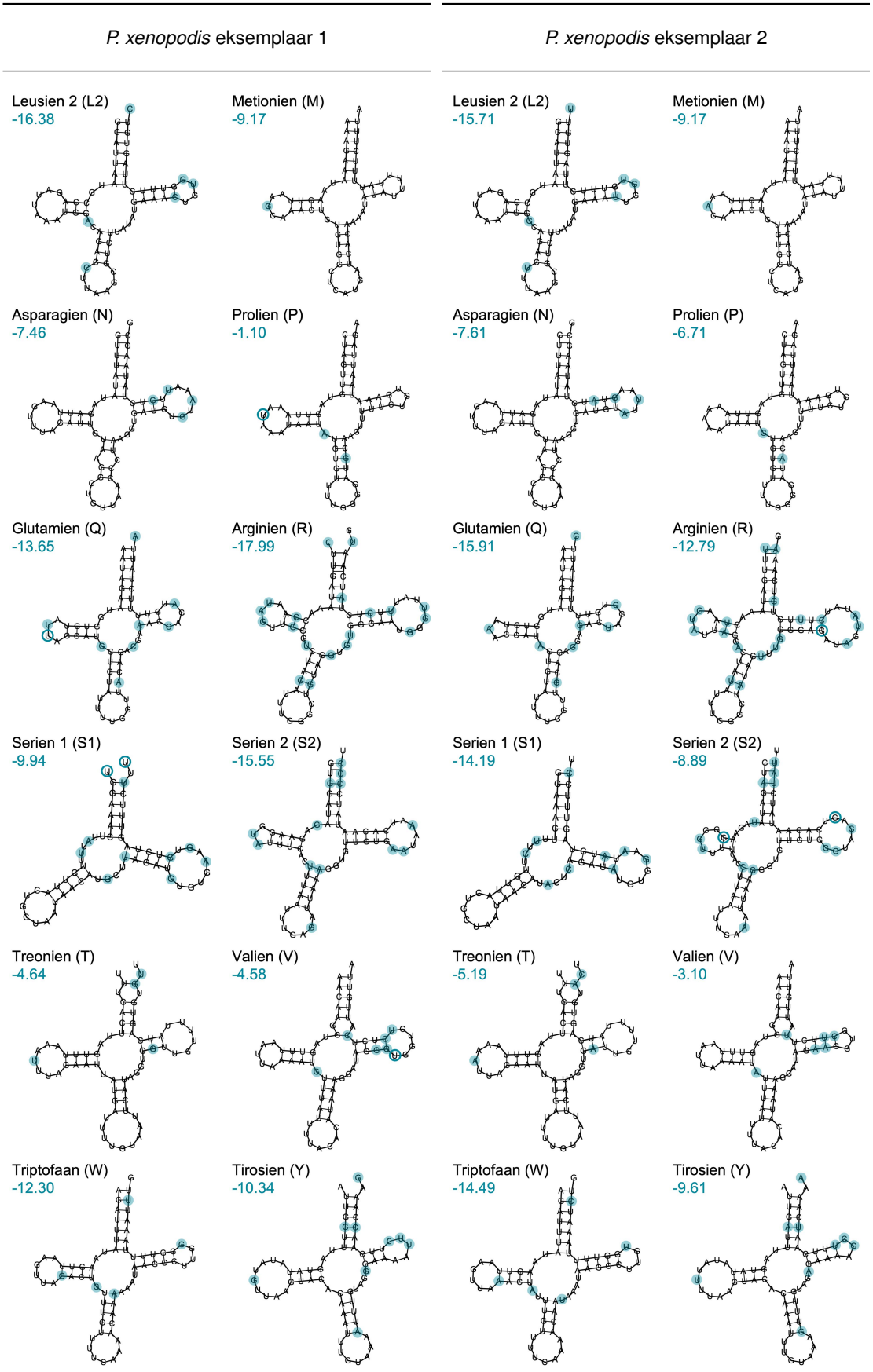
Die inisiasiekodons ATG en GTG is teen gelyke frekwensies ingespan. Beide inisiasiekodons is ingespan om die *NAD4*-geen te inisieer, wat 'n geval van bevolkingspeilheterosigositeit voorstel. Net so is TAG in die meerderheid van gevalle as stop benut, maar TAA en die afgeknotte stopkodons T en TA is ook aangewend. In sommige gevalle waar ons 'n afgeknotte stopkodon voorgelê het, is niegebruiklike stopkodons of bevolkingspeilheterosigositeit ook 'n moontlikheid. Hierdie is waar vir die *COX3*-geen, waar 'n TTA-stopkodon, eerder as 'n afgeknotte T, die geen kan termineer. Nogtans het ons die afgeknotte stop gekies om oorvleueling met die daaropvolgende *trnC* uit te skakel. Asmede kon veranderlike stopkodons ook gebruik word om die*NAD1* (TCG teenoor TCA), *NAD3* (TAA teenoor TAG) en *NAD4*-gene (TAA teenoor TAG), in teëstelling met verkorte stopkodons, te termineer, aangesien die 3'-punte van geeneen van hierdie gene met die 5'-punte van die daaropvolgende tRNAgene oorvleuel nie, ongeag of 'n verkorte of 'n volledige stopkodon toegeken is. Ten slotte het die 3'-punt van die *COX1*-geen met die daaropvolgende *trnG*-geen oorvleuel ongeag of ons 'n verkorte T-stopkodon toegeken het of bevolkingspeilheterosigositeit in die stopkodon aanvaar het (TCA teenoor TAA).

Tabel 7.6: Kodonfrekwensies in die proteïenkoderende gene van *Protopolystoma xenopodis* uitgedruk as 'n breuk van verskynings in elke sinonieme kodonfamilie en as relatiewe kodongebruik (RSCU). GTG en ATG kan as inisiasiekodons optree en word met (i) aangedui. Die mees gebruiklike kodons per mitogenoom word in vetdruk vir elke aminosuur aangedui.

		P. xenopodis eksemplaar 1		*P. xenopodis* eksemplaar 2	
Aminosuur	Drietal	Breuk	RSCU	Breuk	RSCU
A	GCA	0.344	1.38	0.323	1.29
	GCC	0.118	0.47	0.065	0.26
	GCG	0.097	0.39	0.075	0.30
	GCT	**0.441**	1.76	**0.538**	2.15
C	TGC	0.093	0.19	0.071	0.14
	TGT	**0.907**	1.181	**0.929**	1.86
D	GAC	0.095	0.19	0.068	0.14
	GAT	**0.905**	1.81	**0.932**	1.86
E	GAA	**0.516**	1.03	0.455	0.91
	GAG	0.484	0.97	**0.545**	1.09
F	TTC	0.033	0.07	0.027	0.05
	TTT	**0.968**	1.94	**0.973**	1.95
G	GGA	0.152	0.61	0.185	0.74
	GGC	0.097	0.39	0.040	0.16
	GGG	0.218	0.87	0.165	0.66
	GGT	**0.533**	2.13	**0.610**	2.44
H	CAC	**0.589**	1.18	0.375	0.75
	CAT	0.411	0.82	**0.625**	1.25
I	ATA	0.431	1.29	0.423	1.27
	ATC	0.037	0.11	0.033	0.10
	ATT	**0.532**	1.60	**0.544**	1.63
K	AAG	**1.000**	1.00	**1.000**	10.00
L	CTA	0.082	0.49	0.053	0.32
	CTC	0.018	0.11	0.006	0.04
	CTG	0.031	0.18	0.018	0.11
	CTT	0.100	0.60	0.103	0.62
	TTA	**0.420**	2.52	**0.513**	3.08
	TTG	0.349	2.09	0.307	1.84
M	ATG (i)	**1.000**	1.00	**1.000**	1.00
N	AAA	**0.531**	1.59	0.454	1.36
	AAC	0.126	0.38	0.028	0.09
	AAT	0.343	1.03	**0.518**	1.55
P	CCA	**0.473**	1.89	**0.565**	2.26
	CCC	0.121	0.48	0.129	0.52
	CCG	0.187	0.75	0.082	0.33
	CCT	0.220	0.88	0.224	0.89
Q	CAA	**0.724**	1.45	**0.889**	1.78
	CAG	0.276	0.55	0.111	0.22
R	CGA	0.296	1.19	0.327	1.31
	CGC	0.019	0.07	0.091	0.36
	CGG	0.148	0.59	0.055	0.22
	CGT	**0.537**	2.15	**0.527**	2.11
S	AGA	0.094	0.75	0.075	0.61
	AGC	0.036	0.29	0.030	0.24
	AGG	0.094	0.75	0.114	0.91
	AGT	0.251	2.01	0.254	2.03
	TCA	0.157	1.26	0.165	1.32
	TCC	0.047	0.37	0.035	0.28
	TCG	0.063	0.51	0.065	0.52
	TCT	**0.259**	2.07	**0.262**	2.10
T	ACA	**0.438**	1.75	**0.385**	1.54
	ACC	0.171	0.69	0.137	0.55
	ACG	0.114	0.46	0.120	0.48
	ACT	0.276	1.10	0.359	1.44
V	GTA	0.175	0.70	0.167	0.67
	GTC	0.017	0.07	0.008	0.03
	GTG (i)	0.259	1.03	0.221	1.89
	GTT	**0.549**	2.20	**0.604**	2.42
W	TGA	0.478	0.96	**0.589**	1.18
	TGG	**0.522**	1.04	0.411	0.82
Y	TAC	0.150	0.30	0.061	0.12
	TAT	**0.850**	1.70	**0.939**	1.88
Stop	TAA	0.083	0.25	0.000	0.00
	TAG	**0.500**	1.50	**0.500**	1.50
	T– –	0.417	1.25	0.500	1.50



Figuur 7.2: Voorspelde sekondêre strukture van die oordraer-RNA's wat deur die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis* gekodeer word, soos uitgebeeld deur MiTFi. Waardes in blou stel vry-energievlakke van die strukture, uitgedruk in kcal/mol, voor. Intraspesieverskille in die tRNA-gene tussen die twee eksemplare, soos deur die Clustal Omega-belyning uitgeken, word met blou sirkels aangedui. Gevulde sirkels wys nukeotiedvervangings aan en ongevulde sirkels invoegings.



Figuur 7.2: Voorspelde sekondêre strukture van die oordraer-RNA's wat deur die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis* gekodeer word (*vervolg*).

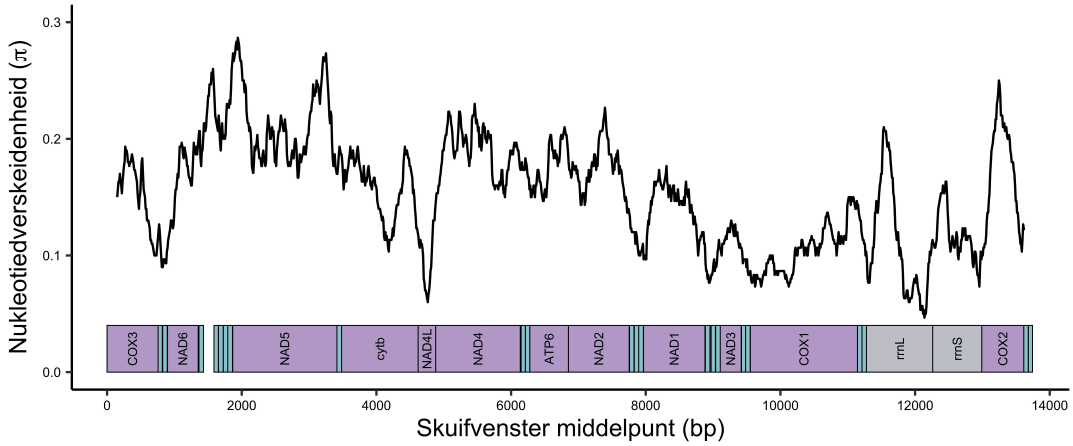
Altesaam was fenielalanie, leusien, serien en valien die aminosure wat die mees dikwels deur die PCG'e kodeer is, verteenwoordigend van ongeveer 50% van alle aminosure wat gebruik is. Om hierdie aminosure te kodeer is die betreklik AT-ryke drietalle van AGT, TCA, TCT, TTA, TTG, TTT, GTG en GTT verkies (Tabel 7.6). Daarteenoor was glutamiensuur, histidien, lisien, glutamien en arginien, mees geredelik deur die drietalle GAA, GAG, CAC, CAT, AAG, CAA en CGT (Tabel 7.6) kodeer, die aminosure wat die minste ingespan is. Kodonverbruik was om en by dieselfe in die PCG'e van beide die volgordes van *P. xenopodis* (Tabel 7.6), met onderlinge afwykings in die mees algemeen aangewende kodon slegs by aminosure met algehele lae verbruik, soos glutamiensuur (1.9%), histidien (1.6%), asparagien (4.1–4.2%) en triptofaan (2.7–2.8%).

Die twee rRNA-gene het neffens mekaar gelê, met die *trnT* en *COX2*-gene aan weerskante met geen tussengeengapings nie. Die twee gene was nie dieselfde lengte in die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* nie, met 'n paarsgewyse identiteit van 87.4% in die *rrnS*-geenpaar en 89.2% in die *rrnL*-geenpaar. In totaal het die twee rRNA gene 12.5% van die mitogenoom van *P. xenopodis* in beslag geneem.

Die mitogenoom van *P. xenopodis* kodeer 22 tRNA-gene (Figuur 7.1). Die gene is tussen 59 en 70 bp lank (Tabel 7.4). Buiten *trnS1*, wat nie oor die dihidro-uridienarm (DHU) beskik nie, is daar voorspel dat al die tRNA's die tipiese klawerblaarstruktuur sal voorstel as dit gevou word (Figuur 7.2). By die vergelyking van die tRNA-gene in die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis*, was nukleotiedvervangings meer volop as verskille in tRNA-geenlengte waargeneem (Figuur 7.2). Die nukleotiedverskille in die tRNA-gene tussen die twee volgordes van die mitogenoom van *P. xenopodis* is hoofsaaklik in die TΨC-lus (vervangings en indels in 16 van 22 tRNA-gene waargeneem) en -stam (in 13 tRNA-gene), die akseptorstem (in 15-tRNA gene) en die DHU-lus (in 14 tRNA-gene) aangeteken. Basisverskille in die DHU-stam was minder algemeen (in 5 tRNA-gene). Dieselfde was gevind vir die antikodonstam (in 10 tRNA-gene) en die veranderlike lus (in 8 tRNA-gene). Dit is aanmerklik dat die vervangings wat in die stamme van al vier arms gevind is, in die meeste gevalle nie vergoedended basisveranderinge was nie, wat beteken dat wangepaarde basisparings algemeen was. Nukleotiedvervangings in die antikodonlus self is slegs in die *trnL1* en *trnS2*-gene waargeneem.

'n Ongepaarde A-basisinvoeging is in die akseptorstam van die *trnI*-geen se sekondêre struktuur van beide die *P. xenopodis*-mitogenoomvolgordes opgemerk. Sekondêre lusse wat deur ongepaarde basisse gevorm is, was in die akseptor-, DHU- of antikodonstamme van verskeie van die tRNA-gene se sekondêre strukture opgemerk. 'n Ongepaarde basispaar in die DHU-stam van die sekondêre struktuur van die *trnE*-geen was slegs in een van die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* gevind.

In ons studie is die nukleotiedverskeidenheid in die mitogenoom van *P. xenopodis* slegs op grond van twee volgordes bepaal. Dit is dus nie op 'n verteenwoordigende monster van



Figuur 7.3: Nukeotiedverskeidenheid (π) tussen die twee nuut geannoteerde mitochondriese volgordes van *Protopolystoma xenopodis*, soos bereken deur 'n skuifvensteranalise (venstergrootte 300 bp, stapgrootte 10 bp) van die aaneengeskakelde belynings van alle gene en niekoderende gebiede. Die grense van die belynde gene word onder aangedui.

die mitogenoom van *P. xenopodis* gebasseer nie. Hierdie twee volgordes was merkbaar verskillend, met 'n algehele paarsgewyse identiteit van 84.2%. Die verskille was meer opvallend in sekere streke van die mitogenoom (Figuur 7.3). In die besonder is die hoogste pieke in veranderlikheid in die langste NCR van die mitogenoom en die 5'- en 3'-punte van die *NAD5*-geen gevind.

Gene met die hoogste nukleotiedverskeidendheid teenoor eenheidlengte was *ATP6*, *COX2*, *NAD2*, *NAD4–5* en *rrnL*. Dié het met paarsgewyse identiteite van onderskeidelik 78.1%, 80.2%, 82.2%, 82.3%, 89.2% en 81.2% ooreengestem, vir dié gene wat merendeels identiteit laer as die globale gemiddelde identiteit vertoon het. Die gene vir *COX1*, *NAD3* en *NAD4L* en die 3'-punte van beide die rRNA-gene was onder die mees behoue streke in die twee volgordes met paarsgewyse identiteite van 93.9%, 86.8% and 89.3% vir die drie PCG'e. Insgelyks was die veranderlikheid van die tRNA-gene laag, daar die gene vir *trnK*, *trnP*, *trnI*, *trnH* en *trnM* paarsgewyse identiteite van onderskeidelik 98.5%, 95.3%, 95.6%, 95.5% en 98.4% tentoongestel het.

7.3.4 Vergelyking met ander poliopistokotileërmitogenome

Op grond van die twee beskikbare mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* het ons aangeneem dat geenorde binne die spesie behoue gebly het. Terselfdertyd het drie geenblokke regoor al die beskikbare poliopistokotileërmitogenome behoue gebly, naamlik die vyf gene vanaf *NAD5* tot *NAD4*, die dertien gene vanaf *ATP6* tot *COX1* en die vier gene vanaf *trnT* tot *COX2* (Figuur 7.4). 'n Geenherranskikkingsbrandpunt is in die Polyopisthocotylea tussen die *COX3* en *NAD5*-gene gemerk, wat beteken dat die tRNA-

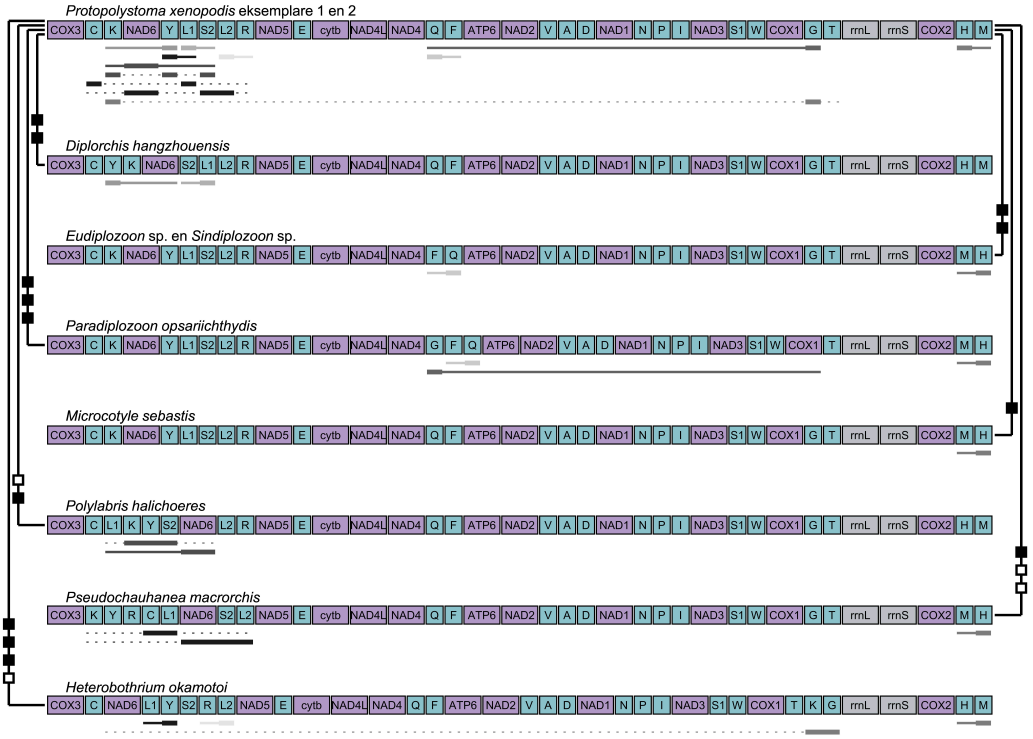
gene *trnC*, *trnK*, *trnL1*, *trnL2*, *R*, *trnS2* en *trnY* dikwels by oomblikke van transposisie of tandemduplikasie-stogastiese verlies (TDRL) betrek is.

Ingevolge die paarsgewyse vergelykings het twee transposisies van tRNA-gene die twee polistomatiedmitogenome van *P. xenopodis* en *D. hangzhouensis* van mekaar onderskei. Twee verdere tRNA-geentransposisies het dikwels die verskille tussen die mitogenome van *P. xenopodis* en sommige van die ander agt poliopistokotileërspesies getipeer. Nog twee verdere tRNA-geentransposies het die mitogenome van *P. xenopodis* en *Heterobothrium okamotoi* Ogawa, 1991, onderskei. Bo en behalwe hierdie tRNA-transposisies het die langafstandtransposisie van ’n verdere tRNA-geen die verskil in mitochondriese geenorde tussen *P. xenopodis* en *Pa. opsariichthydis* bepaal. Die TDRL van twee tRNA-gene het insgelyks die mitogenome van *P. xenopodis* en *H. okamotoi* onderskei. Laastens was die TDRL van die *NAD6*-geen en sy omliggende tRNA-gene, gekoppel met ’n transposisie in die geval van *Polylabris halichoeres* Wang *et* Zhang, 1998 en ’n tweede TDRL-scenario in die geval van *Ps. macrorchis* die enigste oomblikke waar ’n PCG by geenordeherrangskikkings betrokke was.

Onder die beskikbare poliopistokotileërmitogenome was *P. xenopodis* s’n die kortste (Tabel 7.7), wat met sy hoë mitogenoomdigtheid ooreengestem het. Hoewel die mitogenome vergelykbaar was in terme van die aantal NCR’e, was die langste tussengeenstreek in die mitogenoom van *P. xenopodis* heelwat korter (149–150 bp) as die langste tussengeenstreek in enige van die ander Polyopisthocotylea (314–2000+ bp). Boonop is geen streke met tandemherhalings in die mitogenoom van *P. xenopodis* opgespoor nie. Insonderheid het die vername NCR’e van die mitogenome van beide *D. hangzhouensis* en *P. xenopodis* min of meer tussen die *NAD6* en *NAD5*-gene gelê, terwyl die langste NCR’e van al die ander ondersoekte volledige poliopistokotileërmitogenome voor die *NAD6*-geen en na die *COX3*-geen gelê het.

7.3.5 Mitogenoomfilogenie

Die aaneengeskakelde belyning van die 14 mitochondriese gene van 12 beskikbare poliopistokotileërspesies en twee monopistokotileërspesies as buitegroepe het opgetel tot 13 346 nukleotiede. Die topologieë wat deur die ML- en BI-analises gelewer is, was identies (Figuur 7.5). Beide analises het aangedui dat die polistomatiede basaal tot al die ander beskikbare poliopistokotileërs geleë is. Dit is ook merkbaar die die aantal nukleotiedvervangings per ligging tussen die twee *P. xenopodis*-volgordes hoër as die tussengeneriese verskille van sommige ander poliopistokotileërspesies was.



Figuur 7.4: Geenorderangskikkingscenarios tussen nege poliopistokotileërmitogenome, gebaseer op die paarsgewyse vergelyking van sewe volledige mitogenome met die nuut geannoteerde volgordes van *Propopolystoma xenopodis*. Swart vierkante op die lyne wat die pare koppel en die soliede lyne onder die herrangskikde geenblokke dui gevalle van transposisie aan, terwyl with blokkies en onderbroke lyne scenarios van tandemduplikasie-stogastiese verlies voorstel. Verdikte gedeeltes van die lyne onder die geenblokke wys die verplaasde geen of gene in die paarsgewyse vergelyking met *P. xenopodis* aan. Volgordes word lineêr voorgestel. Geen- en genoomgroottes is nie op skaal nie en niekoderende gebiede is uitgelaat.

7.4 Bespreking

Ons vertoon en vergelyk die volledige mitogenoomvolgordes van twee eksemplare van *P. xenopodis*, 'n polistomatiedparasiet van die gewone platanna *X. laevis*. Hiermee dra ons die eerste volledig geannoteerde mitogenoom van die familie Polystomatidae by tot die groep beskikbare monogeneëmitogenome. Vóór die huidige studie was die onvolledige voorlopige mitogenoom van die polistomatied *D. hangzhouensis* die enigste verteenwoordigende mitogenoom van die familie (Zhang *et al.*, ongepubl.). Daarbenewens is dit ook die eerste mitogenoomwye intraspesifieke vergelyking wat binne die Polyopisthocotylea uitgevoer is en een van bitter min sulke vergelykings in die klas Monogenea.

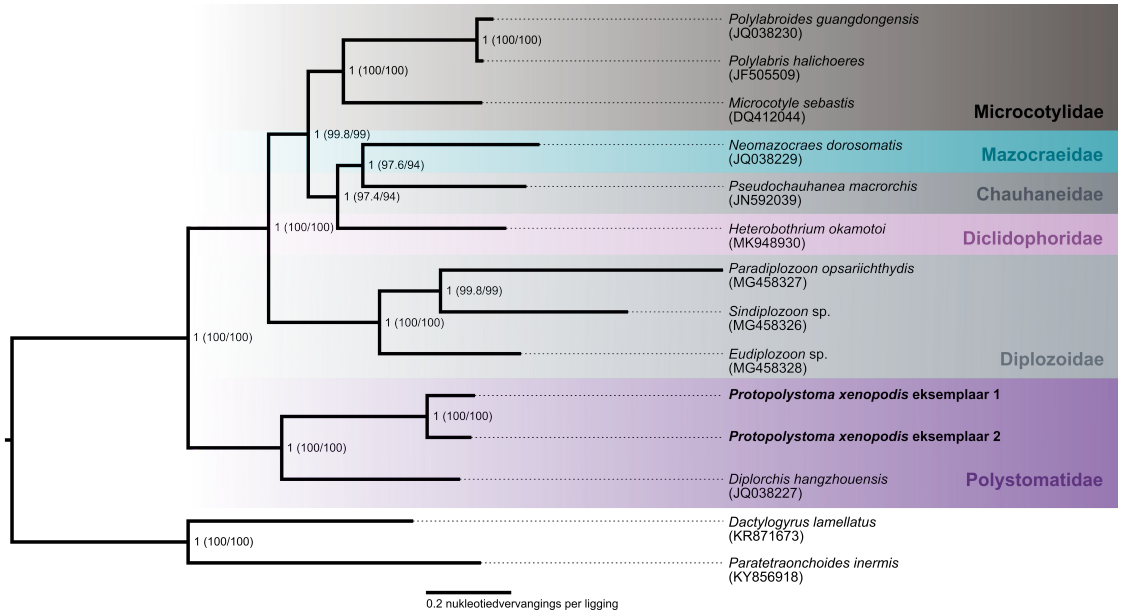
Polystomatidae word as die vroegste divergerende poliopistokotileërklade beskou (Mollaret *et al.*, 2000), 'n posisie wat deur die filogenetiese analises van die beskikbare poliopistokotileërmitogenome in hierdie en ander studies bevestig is (Kim *et al.*, 2020a,b; Nam *et al.*, 2020). Origens is die genus *Protopolystoma* ook die sustergroep van alle ander polysto-

Tabel 7.7: Vergelyking van die algemene eienskappe van al die voorheen gepubliseerde, volledige mitochondriese genome van poliopistokotileërs met die nuut geannoteerde mitogenoomvolgordes van *Protopolystoma xenopodis*. Soos aangedui in die oorsponklike aantekeninge van hierdie mitogenome, meld ons mitogenoomlengte, A + T-inhoud, kodons wat die 12 proteïenkoderende gene inisieer en termineer met hulle frekwensies in hakies en die uitsonderings op die tipiese klawerblaaragtige sekondêre strukture van gevoude oordraer-RNA (tRNA) van elke mitogenoom, tesame met die aantal en minimum- en maksimumlengtes van die nie-koderende gebiede (NCR) en die aantal en lengte van die herhalende eenhede in, of die totale lengte van, die hoogs herhalende gebiede (HRR), na gelang van hoe die inligting beskikbaar gemaak is.

Poliopistokotileërspesies	Verwysing	Lengte (bp)	A+T (%)	Inisiasiekodons	Stopkodons	tRNA-uitsonderings	NCR'e en HRR'e
Microcotylidae							
Microcotyle caudata	MT180126 (Nam *et al.*, 2020)	14 267	70.8	ATA(1); ATG(10); ATT(1)	TAA(8); TAG(2); TAT(1); TTA(1)	*trnS1* geen DHU-arm	verskeie NCR'e; 1 HRR (349 bp in totaal)
Microcotyle sebastis	DQ412044 (Park *et al.*, 2007)	14 407	70.5	ATA(1); ATG(10); ATT(1)	TAA(7); TAG(3); TA(1); T(1)	*trnS1* & *trnS2* gee DHU-arm	21 NCR'e (1–472 bp); 1 HRR (7.9 (53 bp) eenhede)
Polylabris halichoeres	JF505509 (Zhang *et al.*, 2011)	15 527	72.6	ATG(10); GTG(2)	TAA(5); TAG(7)	nie ondersoek nie	22 NCR'e (1–1939 bp); 1 HRR (17.8 (94 bp) eenhede)
Mazocraeidae							
Mazocraeoides gonialosae Tripathi, 1959	MT015514 (Kim *et al.*, 2020b)	15 106	73.4	ATG(8); ATT(1); GTG(3)	TAA(8); TAG(4)	*trnS1* geen DHU-arm	verskeie NCR'e; 1 HRR (1039 bp in totaal)
Chauhaneidae							
Pseudochauhanea macrorchis	JN592039 (Zhang *et al.*, 2012)	15 031	71.5	ATA(2); ATG(10)	TAA(6); TAG(6)	*trnS1* & *trnS2* geen DHU arm	24 NCR'e (1–1200 bp); 1 HRR (6.9 (88 bp) en 5.2 (107 bp) eenhede)
Diclidophoridae							
Heterobothrium okamotoi	MK948930 (Li *et al.*, 2019)	14 643		ATG(10); GTA(1); GTG(1)	TAA(7); TAG(5)	nie ondersoek nie	19 NCR'e (1–796 bp); HRR'e nie ondersoek nie
Neoheterobothrium hirame Ogawa, 1999	MN984338 (Kim *et al.*, 2020a)	14 588	70.8	ATA(1); ATG(11)	TAA(7); TAG(5)	*trnS1* geen DHU-arm	verskeie NCR'e; 1 HRR (885 bp in totaal)
Diplozoidae							
Eudiplozoon sp.	MG458328 (Zhang *et al.*, 2018b)	14 334	70.7	ATG(7); GTG(4); TTG(1)	TAA(4); TAG (7); T (1)	*trnS1* & *trnS2* geen DHU-arm	25 NCR'e (1–586 bp); geen HRR'e
Paradiplozoon opsariichthydis	MG458327 (Zhang *et al.*, 2018b)	15 385 (NCR onvolledig)	67.4	ATG(10); ATT(2)	TAA(4); TAG (7); T (1)	*trnS1* & *trnS2* geen DHU-arm	21 NCR'e (1–2000+ bp); 1 HRR (>1 (197 bp) en >1 (244 bp) eenhede)
Sindiplozoon sp.	MG458326 (Zhang *et al.*, 2018b)	15 254	68.0	ATG(3); GTG(4); GTT(1); TTG(4)	TAA(1); TAG(8); T(3)	*trnS1* & *trnS2* geen DHU-arm	29 NCR'e(1–1205 bp); 1 HRR'e (7 (11–16 bp) eenhede)
Polystomatidae							
Diplorchis hangzhouensis	JQ038227 (Zhang *et al.*, ongepubl.)	13 918 (draft)	72.1	ATG(9); GTT(1); TTG(1)	TAA(4); TAG(6); T(1)	*trnS1* geen DHU-arm	>23 NCR'e (2–314 bp); geen HRR'e
Protopolystoma xenopodis		13 648–13 675	68.2–70	ATG(5–6); GTG(6–7)	TAA(0–1); TAG(6); TA(2); T(3–4)	*trnS1* geen DHU-arm	20 NCR'e (1–150 bp); geen HRR'e

matiede wat amfibieë parasiteer, synde dit waarskynlik vanaf alle ander polistomatiede in die klade ongeveer 275 mijoen jare gelede divergeer het (Héritier *et al.*, 2015). Gevolglik maak die nuut gekarakteriseerde mitogenoom van *P. xenopodis* 'n unieke bydrae tot die beskikbare mitogenomiese data van Polyopisthocotylea in die besonder en Monogenea in die algemeen. Dus kan ons die mitogenoomargitektuur van vroeër divergerende en meer efgeleide klades in hierdie groep vergelyk.

Een kenmerk wat deur die mitogenome van beide die bestudeerde polistomatiede gedeel word is die oënskynlike gebrek aan 'n hoogs herhalende gebied, 'n verskynsel wat



Figuur 7.5: Meerderheidsbeginselkonsensusboom vanaf die Bayes-inferensie (BI) van filogenie van 14 mitochondriese gene van 12 poliopistokotileërspesies, insluitend twee volgordes van die nuut geannoteerde *Protopolystoma xenopodis*, met *Dactylogyrus lamellatus* en *Paratetraonchoides inermis*, monopistokotileërspesies, as buitegroepe. Vertakpuntsteun, in die volgorde a posteriori-waarskynlikheid, SH-agtige benaderde waarskynlikheidsverhouding en ultra-vinnige skoenlus, word aan die regterkant van vertakpunte aangedui. Die topologie van die maksimumwaarskynlikheidsboom (ML) is identies aan die BI-boom s'n. Poliopistokotileërfamilies word in kleur verhelder. Taklengtes dui die verwagte aantal nukleotiedvervangings per ligging aan.

nog net in een ander poliopistokotileërmitogenoom tot dusver gespeur is (Zhang *et al.*, 2018b). Die ingewikkeldheid en lengte van die herhalende gebiede wat in die vroegste geannoteerde poliopistokotileërmitogenome opgemerk is, het ondersoekers gelei om te veronderstel dat die vername NCR'e in hierdie mitogenome langer en meer herhalende eenhede as hulle monopistokotileëreweknieë bevat (Zhang *et al.*, 2011, 2012). Die hipotese is deur die ontdekking van 'n vergelykbare vername NCR in onlangs gemonteerde monopistokotileërmitogenome weerlê (Ye *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018c, 2019b, 2020).

Onder al die die monogeneërmitogenome waarvan die volgordes al bepaal is, is slegs die vername NCR'e van die monogeneërkapsaliede *Benedenia seriolae* (Yamaguti, 1934) Meserve, 1938 en *Neobenedenia melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963 korter as die vername NCR van *P. xenopodis* (sien Perkins *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Nietemin, die ongeveer 150bp wat tussen die *trnY* en *trnL1*-gene in die mitogenoom van *P. xenopodis* geleë is, stel sekere kenmerke tentoon wat dit wil laat blyk asof die funksie van die vername NCR nie ingeperk is nie, ten spyte van die relatiewe kort lengte. Dit sluit mikrosatelliet-agtige TA•-streke, mononukleotiedherhalings en die moontlikheid tot stamlusstrukture in. Hierdie kenmerke is almal al as aanduiders van die teenwoordigheid van 'n beheerstreek voorgestel wat 'n rol in die inisiasie van replikasie in metasoönmitogenome speel (Cameron, 2014; Fumagalli *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016; Shui *et al.*, 2008; Zhang

et al., 1995; Zhang & Hewitt, 1997). Dat dit dieselfde rol in monogeneërmitogenome vervul, is al voorgestel, maar nog nie gedemonstreer nie (Le *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2007).

Met sy relatiewe kort tussengeenstreke is dit nie verbasend dat die mitogenoom van *P. xenopodis* die kortste en kompakste van al die poliopistokotileërmitogenome wat tot dusver aangeteken is, is nie (Kim *et al.*, 2020a,b; Li *et al.*, 2019; Nam *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011, 2012, 2018b). Selfs wanner dit met die beskikbare monopistokotileërmitogenome vergelyk word, is hierdie mitogenoom korter as die meeste, uitgesonderd die mitogenome van die vier kapsaliede *B. hoshinai* Ogawa, 1984, *B. humboldti* Baeza, Sepúlveda *et* González, 2019, *B. seriolae* en *N. melleni* en die ankirosefalied *Tetrancistrum nebulosi* Young, 1967 (see Baeza *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2012; Kawato *et al.*, 2019; Perkins *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014, 2016). Dit is aanmerklik dat al vyf hierdie mitogenome betreklik kort vername NCR'e bevat wat nie oor lang tandemherhalings beskik nie, maar wel die onmiskenbare tekens van 'n vermeende invertebraatmitogenoombeheerstreek uitstraal wat ook in die vername NCR van *P. xenopodis* is.

Die stellige hoë digtheid en kort lengte van die ander beskikbare polistomatiedmitogenome, dié van *D. hangzhouensis*, stel voor dat lae kompleksiteit van NCR'e dalk 'n sinapomorfie van dié basale klade van die Polyopisthocotylea kan wees. Tandemherhalings in die vername NCR'e van meer onlangs divergerende klades is 'n gevolg van stringglip gedurende replikasie (Levinson & Gutman, 1987; Macey *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2010) en mag derhalwe 'n afgeleide eienskap van sekere poliopistokotoleërspesies eerder as 'n sinapomorfie van die groep wees (in teëstelling met die hipotese van Zhang *et al.*, 2011, 2012).

Die vername NCR in Polyopisthocotylea lê binne die uitgekende geenherrangskikkingsbrandpunt van hierdie subklas, wat die tRNA-gene tussen *COX3–NAD6–NAD5* betrek. Dit steun die konneksie tussen NCR'e en geenherrangskikking (Macey *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2010), waar herrangskikte dele van die mitogenoom aan die beheerstreek grens en sekondêre strukture rekombinasie en herrangskikking tot gevolg kan hê (Cameron, 2014; Erpenbeck *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2002a). Hierdie idee word verder die die feit ondersteun dat NCR'e soms kopieë van skyngene in monogeneërmitochondria bevat, met ander woorde uitgediende kopieë van gene wat duplikate in ander dele van die genoom het (Zhang *et al.*, 2011, 2017, 2018a).

Nogtans kan die montering van hoogs herhalende gebiede 'n uitdaging wees, veral as die lengte van die herhalende eenheid die lesinglengte gedurende montering oorskrei (bv Vanhove *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b). Die onsekerkeid rondom die ware lengte van die vername NCR word vererger as versirkeling van die mitogenoom met die hand in hierdie streek geïmplementeer word, soos by ons volgordes van *P. xenopodis* die

geval was. Hoewel ons keuse van versirkelingspunt taamlik voordiehandliggeng was, is monteringskwessies in hierdie streek steeds iets om in gedagte te hou. In ieder geval is die beskikbare mitogenoom van *D. hangzhouensis* 'n lineêre voorlopige weergawe waarvoor daar geen monteringsinligting beskikbaar gemaak is nie. Weens hierdie redes hanteer ons die kwessie van NCR-lengte en -kompleksiteit in poliopistokotileërmitogenome met omsigtigheid.

By nadere ondersoek van die gene wat teenwoordig is (36 in totaal, geen *ATP8*-geen), die voorspelde tRNA sekondêre strukture en die volopste stop- en inisiasiekodons wat in die PCG'e gebruik word (ATG en GTG vir inisiasie en TAA en TAG vir terminasie), kan ons tot die gevolgtrekking kom dat die polistomatiedmitogenoomargitektuur nie van dié van die standaardneodermaat afwyk nie (Le *et al.*, 2002a; Wey-Fabrizius *et al.*, 2013). 'n Uitsondering is die *NAD6*-geen van *D. hangzhouensis*, waar ons die niegebruiklike GTT-inisiasiekodon voorstel. In die Platyhelminthes is die GTT-kodon ook al as inisiasiekodon vir die *COX1*-gene van die lintwurms *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) en *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) en vir die *ATP6*-geen van die ander lintwurm *Taenia pisiformes* Bloch, 1780, voorgestel (sien Jia *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2001; von Nickisch-Rosenegk *et al.*, 2001). Daarby het Zhang *et al.* (2018b) GTT voorlopig as die moontlike inisiasiekodon van die *NAD3*-geen van die poliopistokotoleër *Sindiplozoon* sp. voorgestel, op grond van die belyning met die ortoloë gene van ander monogeneërs. Nietemin moet ons beken dat, op basis van ons belyning met die ortoloë van meer onlangs vrygestelde poliopistokotileërmitogenome (Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, ongepubl.; huidige studie), ons die inisiasieposisie in twyfel trek en eerder 'n TTG-inisiasiekodon 9 bp stroomop voorstel.

Onder al die beskikbare poliopistokotileërmitogenome (Kim *et al.*, 2020a,b; Li *et al.*, 2019; Nam *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011, 2012, 2018b) word TAA en TAG oorwegend as stopkodons ingespan. Verder word gevalle van verkorte stopkodons (TA of T) gemeld (Park *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018b), wat ook in ons nuutgeannoteerde polistomatiedmitogenome gevind word. Hierdie kodons word volgens oorlewering via poliadenilasie na afloop van transkripsie voltooi (Nakao *et al.*, 2003; Ojala *et al.*, 1981).

As ons die algehele struktuur van die poliopistokotileërmitogenome bekyk, lei die herrangskikking van tRNA-gene tot opvallende variasie in geenorde tussen die spesies, veral in vergelyking met sommige ander platwurmgroepe (Le *et al.*, 2002a; Wey-Fabrizius *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2016). Dit is in die besonder so in die geenherrangskikkingsbrandpunt wat tussen die *COX3* en *NAD5*-gene geleë is (Zhang *et al.*, 2012). Selfs binne die familie Polystomatidae kan die mitogenome van *D. hangzhouensis* en *P. xenopodis* van mekaar deur nie minder nie as twee tRNA-transposisies in hierdie area onderskei word. Onlangse vergelykings van die geenorde van beskikbare monogeneërmitogenome laat die idee dat die evolusie van mitogenoomgeenorde onderbroke is, met sommige families wat hoër vlakke van geenherrangskikking as ander tentoonstel (Zhang *et al.*, 2017, 2018a,b, 2019a).

Selfs al is Polyopisthocotylea die vroegste divergerende tak in die neodermaatfilogenie, stem die geenorde van geeneen van die beskikbare mitogenome van hierdie groep met die voorgestelde voorouerlike geenorde van Neodermata ooreen nie (Zhang *et al.*, 2019a). Bowendien wys ons vergelyking 'n gemeenskaplike geenorde van die PCG'e en rRNA-gene regoor al die beskikbare poliopistokotileërmitogenome vanaf vyf families. Aan die hand van die geenorde van *P. xenopodis*, 'n spesie in die vroegste divergerende klade van die Polyopisthocotylea (Mollaret *et al.*, 2000), sinspeel hierdie op 'n situasie waar die gemeenskaplike voorouer van alle Polyopisthocotylea herrangskikking van die *NAD6–NAD5*-geenblok ondergaan het in vergelyking met die voorgestelde voorouerlike neodermaatgeenorde (Zhang *et al.*, 2019a).

As 'n stappie verder as meeste van die vorige studies op die mitogenome van monogeneërs wat hulle volgordes vanaf 'n enkele individu verkry het (met die fokus op Polyopisthocotylea sien Kim *et al.*, 2020a,b; Li *et al.*, 2019; Nam *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011, 2012, 2018b), het die huidige studie die mitogenoomvolgordes van twee eksemplare van *P. xenopodis* vergelyk. Hierdie vergelyking ontbloot merkbare intraspesifieke veranderlikheid in die mitogenoom van hierdie polistomatied met betrekking tot die algehele volgordelengte en paarsgewyse identiteit, asook die lengte en struktuur van enkele gene en NCR'e. Hierdie veranderlikheid is nog meer opvallend ten opsigte van die feit dat dié eksemplare gedurende 'n enkele parasietopname van een waterliggaam versamel is.

Vir die Monogenea is intraspesifieke vergelykings van volledige mitogenome slegs vir die monopistokotileërs *B. seriolae* en *Gyrodactylus salaris*/*thymalli* Malmberg, 1957, uitgevoer (Huyse *et al.*, 2008; Solá *et al.*, 2015). Die waargenome intraspesifieke variasie in die mitogenoom van *P. xenopodis* is heelwat hoër as vir die mitogenoom van die *G. salaris*-/*thymalli*-kompleks (Huyse *et al.*, 2008). In die twee volgordes van *P. xenopodis* is 15.8% van liggings nie identies nie en algehele lengte verskil met 27 bp. Daarteenoor is daar slegs 'n 2.2% identiteit en 1 bp lengteverskil tussen die twee mitogenome van *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Huyse *et al.*, 2008). Dieselfde geld vir die mitogenoomvolgordes van die kapsalied *B. seriolae* (see Kawato *et al.*, 2019). Onder 12 eksemplare wat vanaf vier prefekture oor Japan versamel is, het die mitogenoomvolgordes slegs by 1% van liggings verskil met 'n algehele lengteverskil van 1 bp (Kawato *et al.*, 2019), alhoewel daar 'n skerp afname in identiteit wat bespeur is wanneer dié met dieselfde spesie vanaf Australië vergelyk is (Perkins *et al.*, 2010). Op die keper beskou is die volgorde-uiteenloping wat in die mitogenoom van *P. xenopodis* te siene is, merkwaardig in vergelyking met ander platwurms (Le *et al.*, 2002a).

By diepere ondersoek kom dit na vore dat die mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis* oor vyf PCG'e van veranderlike lengte beskik (*COX1–3*, *NAD3–4*), een wat twee weergawes van die stopkodon inspan (*NAD4*) en nog een wat 'n veranderlike stopposisie het op basis van 'n raamskuifmutasie (*COX2*). Verskille op die proteïenkoderingspeil is al af en toe onder bevolkings van 'n spesie van triklaadplatwurms (Kenny *et al.*, 2019) en

lintwurms (Le *et al.*, 2001) gemeld. Die mitogenoom van *P. xenopodis* toon dié in die geval van drie PCG'e, naamlik *NAD1*, *NAD3* en *NAD4*. Daar is ook die moontlikheid van 'n veranderlike stopkodon, alhoewel ons voorlopig afgeknotte T-stopkodons aanwys om versigtigheidshalwe. In platwurms is dit al voorgestel vir die vrylewende planariïed *Crenobia alpina* (Dana, 1766), waar die *COX2*-geen dalk 'n TAR-stopkodon mag hê, 'n aanduiding van twee moontlike stopkodons in die bevolking (Solá *et al.*, 2015). Nogtans het Solá *et al.* (2015) ook besluit om die afgeknotte TA-stopkodon toe te ken. Daar is tewens ook merkwaardige nukleotiedverskille in die *rrnS* en *rrnL*-gene tussen die twee eksemplare van *P. xenopodis*, beide met betrekking tot lengte en paarsgewyse identiteit. Dit word algemeen aanvaar dat rRNA-gene meer behoue bly tussen verwante taksa (Vanhove *et al.*, 2013), maar uitsonderings binne die Platyhelminthes is daar wel (e.g. Le *et al.*, 2002b).

Ons beken dat die intraspesifieke verskille wat hier aangetoon word slegs die vergelyking van twee volgordes weerspieël, wat die afleidings wat ons kan maak om toekomstige bevolkingsgenetiese analises by te staan, beperk. Hoe dit ook al sy, die skuifvenster-analise van nukleotiedverskeidenheid van die twee volgordes het heelwat van dieselfde gene uitgeken as dié wat die meeste verskeidenheid tussen die mitogenome van die poliopistokotileërfamilie Diplozoidae en die monopistokotileërfamilies Dactylogyridae, Gyrodactylidae and Diplectanidae gewys het (Huyse *et al.*, 2008; Vanhove *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018a,b). Hierby word die *ATP6*, *NAD2* en *NAD5*-gene as die mees veranderlike merkers in die Diplozoidae ingesluit, met die algemene staafkoderingsgeen *COX1* onder die mins veranderlike (Zhang *et al.*, 2018b). In 'n soortgelyke tussengeenvergelyking van die monogeneër *Gyrdicotylus* se mitogenoomvolgordes is *NAD2* en *NAD5* weereens as die mees veranderlike bestempel, tesame met *NAD1*, *NAD4* en *COX3* (Plaisance *et al.*, 2007; Huyse *et al.*, 2008). In hierdie vergelyking is *COX1* as een van die mees behoue streke uitgeken (Huyse *et al.*, 2008). In dieselfde gees het Vanhove *et al.* (2018) *NAD2* as die beste merker vir die studie van bevolkingspeilprosesse in Afrika-monopistokotileërs uitgewys. In die geval van diplektaniede, is die vinnig-evoluerende *NAD2* en *NAD4–6* as beter merkers as *COX1* voorgestel (Zhang *et al.*, 2018a).

Dientengevolge is dit opvallend dat die steke van hoë binnespesiedivergering in die twee mitogenoomvolgordes van *P. xenopodis*, naamlik *ATP6*, *COX2*, *NAD2*, *NAD4*, *NAD5* en *rrnL*, aangewys is as vinnig-evoluerende merkers regoor die Monogenea. Dit wys die vinger na niestogastiese bevolkingspeilheterosigositeit in die mitogenoom van *P. xenopodis* wat 'n teken van aanvangspesiëring van die verskillende stamlyne in die spesie kan wees. Onlangse analises (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif) van *P. xenopodis* van 'n aantal bevolkings regoor suidelike Afrika het die teenwoordigheid van verskeie divergeerde stamlyne in die spesie beaam. Daarbenewens, as gevolg van omvangryke mensbemiddelde beweging van die gasheer *X. laevis* regoor die streek (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007), mag heelparty bevolkings van die plaaslik inheemse gashere beide plaaslik inheemse en plaaslik uitheemse stamlyne van *P. xenopodis* huisves (Hoofstuk 6 van hierdie

proefskrif). Dus, die hoë divergensie tussen die twee bestudeerde mitogenoomvolgordes in die huidige studie mag dalk ook hierdie onlangse kontak tussen twee verskillende gasheerstamlyne, gevolg deur oorspoeling van die parasiete, weerspieël, in teenstelling met hoë vlakke van divergering in 'n natuurlike, plaaslik inheemse bevolking. Hierdie is in die besonder waarskynlik by hierdie bevolking in Bloemfontein, wat naby aan 'n tersiêre instelling geleë is en wat heelwat besendings van die plaaslik uitheemse *X. laevis* vanaf liggings regoor Suid-Afrika vir onderrig en navorsing ontvang het (van Sittert & Measey, 2016; Weldon *et al.*, 2007). Die vrystelling van hierdie paddas en gevolglike kleinskaaluitbreiding deur plaaslike hengelaars, gebeurtenisse wat gereeld plaasgevind het (Louis du Preez, persoonlike kommunikase), kon die plaaslik uitheemse *X. laevis* in kontak met die inheemse *X. laevis* gebring het. Op hul beurt kon dit die blywendheid van 'n geneties divergerende bevolking van *P. xenopodis* in die waterliggame van Bloemfontein en omgewing verseker.

Die *COX1* en *rrnS*-gene is die enigste twee mitochondriese merkers waarvoor voorvoerders vir polistomatiedplatwurms beskikbaar was. Die merkers is tesame met die nukleêre merkers *18S* en *28S* ingespan om spesiëringspatrone en evolusionêre verwantskappe in die Polystomatidae te bepaal (bv Héritier *et al.*, 2015; Verneau *et al.*, 2009). Meer onlangs is hierdie twee merkers ook in 'n kofilogeografiese studie van *P. xenopodis* en *X. laevis* gebruik (Hoofstuk 6 van hierdie proefskrif). Ons analise stel voor dat *ATP6*, *COX2*, *NAD2*, *NAD4*, *NAD5* en *rrnL* moontlik meer gepas sal wees om tussen verskillende stamlyne van *P. xenopodis* te onderskei. Die volledige mitogenoom verskaf aan toekomstige ondersoekers 'n hulpmiddel om geskikte voorvoerders te ontwikkel. *COX2*, *NAD2* en *rrnL* mag besonder geskik wees vir hierdie taak, aangesien hierdie gene betreklike behoue strekke aan weerskante het waar voorvoerders ontwerp kan word. Uiteraard moet ons voorlopige ondersoek deur een met 'n groter monstergrootte gevolg word. 'n Handige toepassing van volgende-generasie-volgordebepaling, naamlik die volgordebepaling van gepoelde monsters, kan 'n koste-effektiewe benadering wees om die mitogenoomdata van meer eksemplare van *P. xenopodis* vanaf dieselfde bevolking te vergelyk en mitochondriese geenstreke wat geskik is vir bevolkingspeilstudies uit te ken (Karlsen *et al.*, 2014; Mimee *et al.*, 2015; Schlötterer *et al.*, 2014).

Hierdie ondersoeke is regtig krities in die lig van die indringerstatus van nie net die gasheer, *X. laevis*, nie, maar ook sy parasiet, *P. xenopodis*. Die vermoë om hoë-resolusie-merkers te ontwikkel wat die oorsprong en uitbreiding van indringerspesies kan naspeur is 'n belangrike hulpmiddel in enige indringerbioloog se gereedskapskis. Die volledige en geannoteerde mitogenoomvolgorde van *P. xenopodis* bied aan ons die geleentheid om die meganismes van aanvangspesiëring op die binnegasheerpeil met die bykomende komplikasie van spesies aan die beweeg te bestudeer.



Hoofstuk 8

Oorsig en vooruitsigte: die huwelik van indringerbiologie en parasitologie

Die waarde van die insluiting van data van koïngevoerde parasiete in die studie van indringerspesies is in die huidige studie uitgelê. Híér is ongeveer 350 eksemplare van die gewone platanna *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae) en hulle metasoönparasietversamelings van meer as 45 liggings in die natuurlike en vreemde gebiede gebruik as 'n model vir 'n koïndringer-gasheer-parasiet-sisteem. Die toevoeging van parasietdata bied 'n aantal insigte wat andersins vaag sou gebly het.

Eerstens het die studie die belang van die geïntegreerde benadering tot taksonomie tot die beskrywing en verklaring van natuurlike parasietdinamiek uitgelig. Op hul beurt kan die meer robuuste uitkenning van die inheemse parasietfauna van *X. laevis* die bestuur van die gasheer-parasiet-sisteem in die vreemde gebied toelig.

Tweedens kan die wêreldwye replikate van die parasitologiese opnames van hierdie indringeramfibie gebruik word om ou hipoteses in indringerbiologie te toets. Só kan daar lig gewerp word op samebindende patrone in gasheer-parasiet-sisteme gedurende gebiedsuitbreiding. Hierdie analises bekragtig die feit dat biologiese indringergeleenthede as die verplasing van spesiespakette aanskou moet word – gashere met 'n versameling van koïngevoerde en selfs koïndringerparasiete. Bowendien bring hierdie geleenthede komplekse gasheer-parasiet-dinamiek teweeg.

Derdens is die gebruikswaarde van parasietdatastelle as 'n onafhanklike bewyslyn in die ondersoek na die oorsprong en roetes van biologiese indringings gedemonstreer deur die heel eerste toepassing van intraspesie-kofilogeografiese analises op indringerbiologie. Hierdie benadering beklemtoon die nut van holistiese monsterneming in indringerbiologie.

As ’n baanbrekershulpbron is die volledige mitogenoom van die koïngevoerde monogeneërparasiet *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) voorsien om toekomstige ondersoekers by te staan met die ontwikkeling van molekulêre merkers wat vir hulle vlak van kofilogeografiese analises geskik is.

8.1 Die rol van geïntegreerde taksonomie in indringerbiologie

Die uitkenning van spesies vorm die grondslag van alle ondersoeke in ekologie (Ferris & Ferris, 1989). In moderne tye het die raamwerk van geïntergreerde taksonomie die gereedskapskis van taksonome en ekoloë eweseer uitgebrei (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Byvoorbeeld, die opneming van molekulêre data in die sistematiek van verskillende groepe van nematode het aangedui dat morfologiese eienskappe onafhanklik in verskillende stamlyne kan ontspring en is dus dikwels nie gepas as interspesifieke diskriminante nie (Carreno & Nadler, 2003; Tkach *et al.*, 2014). Nogtans skitter die molekulêre data wat só vir filogenetika aangewend kan word steeds steeds in hulle afwesigheid in vele families van die Nematoda (Svitin *et al.*, 2018). Die benadering van beide Svitin *et al.* (2018) en Schoeman *et al.* (2020) (Hoofstukke 2 en 3) maak ’n bloudruk beskikbaar vir hoe mens te werk sal gaan om gapings in taksonomiese inligting in die era van gevorderde beeldvorming en molekulêre tegnieke te vul. In die besonder kan die gebruik van molekulêre staafkodering ’n kortpad wees vir spesie-uitkenning in studies met ekologiese toepassings (soos in Schoeman *et al.* (2019) en Hoofstuk 5 van hierdie proefskrif). Hierdie instrument is wel slegs van toepassing op parasiete waarvan die molekulêre data reeds beskikbaar is, wat die nut van die toevoeging van beide morfologiese en molekulêre data in spesiebeskrywings netjies illustreer.

Op ’n sekere vlak ontbloot die veelvlakkige benadering tot die sistematiek van hierdie nematode voorheen onopgetekende gasheer-parasiet-assosiasies en die sentrale rol van *X. laevis* as parasietreservoir in akwatiese habitatte in sy natuurlike gebied (aan die lig gebring in Hoofstuk 3). ’n Verbasende hoë aantal nuwe parasietassosiasies word ten spyte van meer as 100 jaar van parasitologiese ondersoeke van *X. laevis* aangeteken (sien parasitologiese opnames in Cosgrove & Jared, 1974; Macnae *et al.*, 1973; Pritchard, 1964; Southwell & Kirshner, 1937; Thurston, 1970; Tinsley, 1996; Vercammen-Grandjean, 1960). Bo en behalwe die beklemtoning van die rol van *X. laevis* as ’n veelsydige gasheer vir ’n menigte nematoodparasiete, dien die nuut opgetekende parasietassosiasies as ’n aanduider van trofiese interaksies tussen *X. laevis* en verskeie akwatiese en semiakwatiese dierspesies wat net verder aandui hoe parasiettaksonomie ons begrip van ekologiese interaksies kan uitbrei. Bewapen met hierdie inligting kan toekomstige ondersoekers nou meer geteikende natuurhistoriese studies van *X. laevis* en sy parasiete uitvoer, ’n veld van studie wat grootliks verwaarloos word in ’n era van vinnige wetenskap en groot data (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2021).

Op ’n volgende vlak sien ons hoe ’n gebrek aan duidelike beskrywings en molekulêre data in vorige ondersoeke van die parasiete van *X. laevis* in beide die natuurlike en vreemde gebied mag lei tot valse aannames oor die oorsprong van die parasiete wat hulle met *X. laevis* in die vreemde gebied verbind. In die huidige studie is nematoodlarwe saam met *X. laevis* in sy natuurlike gebied gevind wat aan genera behoort wat ook gemeld is in assosiasie met hierdie padda in die vreemde gebied (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004). Ewenwel, omdat geen molekulêre data by vorige ondersoeke ingesluit is nie en aangesien derdestadiumlarwe onmoontlik net met behulp van morfologiese data uitgeken kan word, is dit algemeen aanvaar dat hierdie spesies nuwe parasietassosiasies in die vreemde gebied voorstel. Hierdie idee kan weerlê word met die toevoeging van nuwe molekulêre data.

As ’n demonstrasie van die raamwerk wat hierbo uiteengesit is, is hierdie molekulêre benadering ook toegepas om tussen digeneërspesies in die parasietopnames te onderskei (Hoofstukke 4 en 5). Digeneërmetaserkarieë lewer dieselfde taksonomiese hindernisse op as larwale nematode. Tog het die staafkodering van die *ITS*-geen van die herwonne digeneërs in Suid-Afrika en Frankryk ’n *Euclinostomum* Travassos, 1928, sp. uitgewys wat *X. laevis* vanaf die natuurlike na die vreemde gebied vergesel het (Hoofstuk 5). Eksemplare van *Euclinostomum* sp. is ook in uitheemse *X. laevis* in Kalifornië herwin (Kuperman *et al.*, 2004). Desondanks, sonder ’n geïntegreerde taksonomiese benadering tot die spesie-uitkenning van digeneërmetaserkarieë in hierdie bevolking sal ons in onkunde bly oor of hierdie ook ’n koïnvoering voorstel.

In die geval van die hereteroksene Digenea en Nematoda sal die koïnvoering van taksa wat ander spesies inspan as finale gashere vêrreikende gevolge hê. Die geïntegreerde taksonomiese benadering tot die nematoodparasiete van *X. laevis* in sy natuurlike gebied het die rol van hierdie gasheer as parasietreservoir beklemtoon, wat ’n hele reeks akwatiese en semi-akwatiese organismes via gedeelde parasiete met mekaal koppel (Hoofstuk 3). Die assosiasies van *X. laevis* met heteroksene parasiete wat oorspronklike van die inheemse fauna van die natuurlike gebied afkomstig is (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014), wys dat hierdie padda ’n soortgelyke rol in sy nuwe omgewings speel. Gegewe hierdie risiko’s, het parasitologiese studies in moderne tye geen verskoning om nie molekulêre data in te sluit nie, selfs as die taksonomiese kennis om breedvoerige morfologiese beskrywings uit te voer, te kort skiet.

As ’n aanbeveling vir toekomstige ondersoeke, wys die huidige studie die Digenea, die mees spesieryke parasiettakson van die inheemse parasietversameling van *X. laevis*, as die mees verwaarloosde taksonomiese groep aan. Daarby benodig die protosoönparasiete van *X. laevis* ernstige taksonomiese hersiening. As ’n uitvloeisel van die tekort aan taksonomiese kennis van die protosoönparasiete van *X. laevis*, het die ondersoeke in die huidige studie slegs op die metasoönparasietdinamiek van *X. laevis* gefokus. Dit het die uitpluis van oorkoepelende tendense oor al die parasietgroepe van hierdie wêreldwye

indringerpadda heen, teruggehou.

8.2 Uitmaak van patrone in indringerbiologie met wêreldwye replikate van koïngevoerde gasheer-parasiet-sisteme

Die opskalering van die spesiepeil na die gemeenskapspeil in hierdie studie het die geleentheid wat deur die vele parasitologiese studies van *X. laevis*, beide in die natuurlike en vreemde gebiede (Castillo *et al.*, 2017; Kuperman *et al.*, 2004; Rodrigues, 2014; Schoeman *et al.*, 2019), aangegryp om algemene tendense in die parasietdinamiek van spesies aan die beweeg, uit te pluis. Met die hulp van hierdie benadering sien ons herhaaldelike parasietverlies in wêreldwye indringer-*X. laevis*, ongeag van kontinent, klimaat, meganisme van parasietverlies of indringergeskiedenis (Schoeman *et al.*, 2019). Nietemin, ten spyte van hierdie algehele neiging na parasietverlies, is die prentjie van op die infragemeenskap na vore kom een van ’n komplekse wisselwerking van intrinsieke en ekstrinsieke faktore wat koïngevoerde parasietdinamiek vorm (Hoofstuk 5).

’n Nadere blik na die parasietdinamiek regoor hierdie geografiese replikate wys dat uitbreiding teenstrydige invloede op die oordrag van verskillende parasietspesies het. Dus, die oorvereenvoudigde idee van verarmde uitheemse parasietversamelings word verdring deur ’n patroon van verhoogde veranderlikheid in die parasietdinamiek van gasheerbevolkings wat onlangs gebiedsuitbreiding ondergaan het.

Vanuit hierdie sienswyse van die tipiese parasietversameling van gashere in uitbreidende bevolkings verwag ons meer ekstreme dinamiek. Dit kan wissel van hoogs geïnfekteerde gasheerindividue tot die afwesigheid van sommige parasietgroepe gekoppel met ’n opbloei in die veelheid van nog ander parasietspesies. Hierdie patroon is by die rand van ’n indringerbevolking gevind, asook by die hoogs versteurde liggings in die natuurlike gebied waar mens pionierbevolkings van die gasheer sou verwag.

In die poging om verklarings vir die uiteenlopende reaksies van verskillende parasietspesies tot die gebiedsuitbreiding van hulle gasheer te vind, kom ons in aanraking met aspekte van die parasietdinamiek van *X. laevis* waar ons kennis skraps is. Elegante en indringende natuurhistoriese eksperimente wat beide in die natuurlike en vreemde gebiede van hierdie gasheer uitgevoer word, kan indringerekoloë ’n dieper verstaan van die koïngevoerde parasiete wat hulle mag teëkom, bied (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2021). In die besonder moet ondersoekers hulle rig tot gasheerimmuunreaksies en ander gasheerspesies wat met hierdie parasiete as intermedieêre of finale gashere gedurende hulle lewensiklusse in aanraking kom.

Met ’n welbeskryfde, wydverspreide model-gasheer-parasiet-sisteem tot ons beskikking kan indringerbioloë *X. laevis* en sy parasiete as bio-aanduiders van versteuring gebruik.

Aangesien *X. laevis* 'n parasietversameling met spesies wat van 'n wye verskeidenheid van ander gashere in hulle lewensiklus gebruik maak, huisves (Schoeman *et al.*, 2020), sal die afname of selfs afwesigheid van sekere parasietspesies 'n goeie aanduider wees van ekosisteemgesondheid en die rypheid van die vestiging van indringergashere in 'n ekosisteem.

8.3 Parasiete as aanvullende bewysstukke in bio-indringernavorsing

Die finale toepassing van hierdie gasheer-parasiet-model is 'n vergelykende filogeografiese studie wat dit reggekry het om beide die intraspesifieke kriptiese invoering van *X. laevis* in sy natuurlike gebied en die uitbreidingsnetwerke wat hierdie wydverspreide verplasing bewerkstellig het, behendig uit te ken (Hoofstuk 6). Hierdie benadering ontbloot verskeie oomblikke van gasheerstamlynwisseling deur sy polistomatiedparasiet *P. xenopodis*, wat as merker vir kontak tussen filogeografies uitkenbare stamlyne van *X. laevis* optree. Buite en behalwe die beskikbaarheid van 'n gasheerdatastel van gelyke grootte wat uit ortoloë mitochondriese merkers bestaan, vervul die parasietdatastel die rol van 'n onafhanklike bewyslyn wat tendense kan uitwys wat verborge is in gasheerfilogeografie.

Op hierdie wyse dien die model as 'n konsepbewys vir die potensiaal van die kofilogeografiese benadering om patrone in intraspesifieke gasheerdivergensie en -uitbreiding te verklaar. Op hul beurt kan dit bykomende insigte oor indringerroetes na vore bring en bestuur- en bewaringstrategieë toelig. Op grond van die sukses van hierdie benadering word dit duidelik dat studies in indringerbiologie baat sal vind by die insluiting van "holistiese eksemplare" (Cook *et al.*, 2017). Hierdie relatief nuwe benadering tot monsterneming bepleit die versameling van teikenspesies saam met hulle simbionte (Cook *et al.*, 2017). Selfs in gevalle waar hierdie simbionte nie direk verwerk kan word nie, sal hulle bewaring as kontrole-eksemplare 'n skatkis wees vir toekomstige ondersoeke (Thompson *et al.*, 2021).

Die bostaande konsepbewys versinnebeeld hoe belangrik die ontwikkeling van hoë resolusie merkers om die oorsprong en uitbreiding van indringerspesies na te speur, kan wees in die indringerbioloog se gereedskapskis. Die monogeneërfamilie Polystomatidae doem op as 'n uitstekende merker vir gasheerbeweging op die intraspesiepeil, net soos wat vir ander monogeneërs gevind is (Huyse *et al.*, 2015; Kmentová *et al.*, 2019; Ondračková *et al.*, 2012). Hulle is selfs meer belowend vanweë die koïndringerstatus van verskeie polistomatiedspesies (Héritier *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2015; Schoeman *et al.*, 2019; Verneau *et al.*, 2011). Om die gebruik van polistomatiedmonogeneërs as merkers vir gasheerverplasing in toekomstige studies te vereenvoudig, is die volgorde en struktuur van die eerste volledige mitochondriese genoom van 'n polistomatiedplatwurm bepaal, naamlik

dié van *P. xenopodis* (Hoofstuk 7). 'n Voorlopige analise het streke in die mitogenoom belig wat meer gepasde merkers vir intraspesifieke filogeografiese studies kan wees as die *COX1* en *rrnS* wat tans gebruik word. Hierdie bevinding sal deur 'n ondersoek met 'n groter monstergrootte bevestig word, moontlik via die koste-effektiewe volgordebepaling van gepoelde monsters (Karlsen *et al.*, 2014; Mimee *et al.*, 2015; Schlötterer *et al.*, 2014).

8.4 'n Toekomsblik op indringerbiologie vanuit die standpunt van 'n parasitoloog

Dit staan vas dat die beweging van natuurlewe voortaan ons rus gaan versteur (Capinha *et al.*, 2015; Chinchio *et al.*, 2020; Morens *et al.*, 2020). Soos wat vrylewende spesie nuwe omgewings bevaar, sal assosiasies met hulle parasiete oor tyd en afstand skuif wat aanleiding sal gee tot nuwe interaksies met vêrreikende effekte (Amundsen *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2012; Dunn & Hatcher, 2015; Roy & Lawson Handley, 2012; Telfer & Bown, 2012). Vanuit die oogpunt van 'n parasitoloog verskaf hierdie aan ons 'n eersteklas geleentheid om die meganismes wat gasheer-parasiet-assosiasies vorm, uit te plus, veral ten tyde van gasheergebiedsuitbreiding. Deur die bril van 'n indringerbioloog kan parasiete reeds by ondersoeke ingelyf word tydens projekopstelling as 'n onafhanklike bewyslyn. Deur die samekoms van hierdie twee dissiplines, gee dié studie 'n demonstrasie die toepassing van 'n multidissiplinêre benadering tot die dinamiek van gebiedsuitbreiding met behulp van 'n welbestudeerde modelsisteem van 'n wêreldwye indringeramfibieërgasheer en sy metasoönparasiete.

Bibliografie

Aguiar, A., Toledo, G. M., Anjos, L. A. & Silva, R. J. 2015. Helminth parasite communities of two *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leiuperidae) populations under different conditions of habitat integrity in the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75:963–968. https://doi.org/10.1590/1519-6984.03614

Ahyong, S. T., Kupriyanova, E., Burghardt, I., Sun, Y., Hutchings, P. A., Capa, M. & Cox, S. L. 2017. Phylogeography of the invasive Mediterranean fan worm, *Sabella spallanzanii* (Gmelin, 1791), in Australia and New Zealand. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 97:985–991. https://doi.org/10.1017/S0025315417000261

Aisien, S. O., Ayeni, F. & Ilechie, I. 2004. Helminth fauna of anurans from the Guinea savanna at New Bussa, Nigeria. *African Zoology*, 39:133–136

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410

Amaro, R. C., Nunes, I., Canedo, C., Napoli, M. F., Junca, F. A., Verdade, V. K., ... Rodrigues, M. T. 2013. A molecular phylogeny recovers *Strabomantis aramunha* Cassimiro, Verdade and Rodrigues, 2008 and *Haddadus binotatus* (Spix, 1824) (Anura: Terrarana) as sister taxa. *Zootaxa*, 3741:S569–S582. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3741.4.7

Amundsen, P. A., Lafferty, K. D., Knudsen, R., Primicerio, R., Kristoffersen, R., Klemetsen, A. & Kuris, A. M. 2013. New parasites and predators follow the introduction of two fish species to a subarctic lake: implications for food-web structure and functioning. *Oecologia*, 171:993–1002. https://doi.org/10.1007/s00442-012-2461-2

Anderson, R. C. 2000. *Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission*. 2nd ed. Wallongford, UK: CABI Publishing.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., ... Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457–465. https://doi.org/10.1038/290457a0

Avery, R. A. 1971. A preliminary list of parasites collected from reptiles and amphibians in northern Nigeria. *British Journal of Herpetology*, 4:217–219

Baeza, J. A., Sepúlveda, F. A. & González, M. T. 2019. The complete mitochondrial genome and description of a new cryptic species of *Benedenia* Diesing, 1858 (Monogenea: Capsalidae), a major pathogen infecting the yellowtail kingfish *Seriola lalandi* Valenciennes in the South-East Pacific. *Parasites & Vectors*, 12, art. 490. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3711-5

Baker, M. R. 1983. Nematode parasites of the turtle *Pelusios sinuatus* (Pelomedusidae: Pleurodira) from southern Africa. *Systematic Parasitology*, 5:161–167. https://doi.org/10.1007/bf00009348

Balbuena, J. A., Miguez-Lozano, R. & Blasco-Costa, I. 2013. PACo: a novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PLOS One*, 8, e61048. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061048

Baldwin, R. E., Banks, M. A. & Jacobson, K. C. 2012. Interating fish and parasite data as a holistic solution for identifying the elusive stock structure of Pacific sardines (*Sardinops sagax*). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22:137–156. https://doi.org/10.1007/s11160-011-9227-5

Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37–48. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Bar-On, Y. M., Phillips, R. & Milo, R. 2018. The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 115:6506–6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115

Barnett, L. K., Phillips, B. L., Heath, A. C. G., Coates, A. & Hoskin, C. J. 2018. The impact of parasites during range expansion of an invasive gecko. *Parasitology*, 145:1400–1409. https://doi.org/10.1017/s003118201800015x

Barson, M. 2004. The occurrence of *Contracaecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae) in the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) from Lake Chivero, Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71:35–39. https://doi.org/10.4102/ojvr.v71i1.283

Barson, M. & Avenant-Oldewage, A. 2006. Nematode parasites of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) from the Rietvlei Dam, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 73:87–94. https://doi.org/10.4102/ojvr.v73i2.152

Barson, M., Bray, R., Ollevier, F. & Huyse, T. 2008. Taxonomy and faunistics of the helminth parasites of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) from temporary pans and pools in the Save-Runde river floodplain, Zimbabwe. *Comparative Parasitology*, 75:228–240. https://doi.org/10.1654/4337.1

Baylis, H. A. 1934. A little known nematode parasite of the eel. *Annals and Magazine of Natural History, Series 10*, 13:235–240

Baylis, H. A. 1939. Some parasitic worms from the Belgian Congo. *Annals and Magazine of Natural History, Series 11*, 4:401–404

Bellard, C., Genovesi, P. & Jeschke, J. M. 2016. Global patterns in threats to vertebrates by biological invasions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, art. 20152454. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2454

Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsch, G., ... Stadler, P. F. 2013. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondiral genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69:313–319. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023

Bernt, M., Merkle, D., Ramsch, K., Fritzsch, G., Perseke, M., Bernhart, D., ... Middendorf, M. 2007. CREx: inferring genomic rearrangements based on common intervals. *Bioinformatics*, 23:2957–2958. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm468

Berthier, P., du Preez, L. H., Raharivololoniana, L., Vences, M. & Verneau, O. 2014. Two new species of polystomes (Monogenea: Polystomatidae) from the anuran host *Guibemantis liber*. *Parasitology International*, 63:108–119. https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.014

Bertolino, S., Wauters, L. A., De Bruyn, L. & Canestri-Trotti, G. 2003. Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. *Oecologia*, 137:286–295. https://doi.org/10.1007/s00442-003-1345-x

Beverley-Burton, M. 1963. Some digenetic trematodes from amphibians and reptiles in Southern Rhodesia including two new species and a new genus: *Sarumitrema hystatorchis* n.gen., n.sp. (Plagiorchiidae) and *Halipegus rhodiensis* n.sp. (Halipegidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 30:49–59

Bibb, M. J., van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W. & Clayton, D. A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26:167–180. https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90300-7

Blackburn, T. M. 2008. Using aliens to explore how our planet works. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105:9–10. https://doi.org/10.1073/pnas.0711228105

Blackburn, T. M., Bellard, C. & Ricciardi, A. 2019. Alien versus native species as drivers of recent extinctions. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17:203–207. https://doi.org/10.1002/fee.2020

Blackburn, T. M. & Ewen, J. G. 2017. Parasites as drivers and passengers of human-mediated biological invasions. *EcoHealth*, 14:61–73. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1092-6

Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., ... Richardson, D. M. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26:333–339. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023

Blakeslee, A. M. H., Byers, J. E. & Lesser, M. P. 2008. Solving cryptogenic histories using host and parasite molecular genetics: the resolution of *Littorina littorea*'s North American origin. *Molecular Ecology*, 17:3684–3696. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.03865.x

Boane, C., Cruz, C. & Saraiva, A. 2008. Metazoan parasites of *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae) from Mozambique. *Aquaculture*, 284:59–61. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.037

Bobadilla-Suarez, M., Ewen, J. G., Groombridge, J. J., Beckmann, K., Shotton, J., Masters, N., ... Sainsbury, A. W. 2017. Using qualitative disease risk analysis for herpetofauna conservation translocations transgressing ecological and geographical barriers. *EcoHealth*, 14:47–60. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1086-4

Bolek, M. G. & Coggins, J. R. 2001. Seasonal occurrence and community structure of helminth parasites in green frogs, *Rana clamitans melanota*, from southeastern Wisconsin, USA. *Comparative Parasitology*, 68:164–172

Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30:2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. & White, J. S. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 24:127–135. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008

Boomker, J. 1982. Parasites of South African freshwater fish. I. Some nematodes of the catfish [*Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)] from the Hartbeespoort Dam. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 49:41–51

Boomker, J. 1994a. Parasites of South African freshwater fish. VI. Nematode parasites of some fish species in the Kruger National Park. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61:35–43

Boomker, J. 1994b. Parasites of Southern African freshwater fish. VII. Nematodes of some scaled fishes from the Hartbeespoort Dam, Transvaal. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61:197–199

Brayton, C. 1992. Wasting disease associated with cutaneous and renal nematodes in commercially obtained *Xenopus laevis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 653:197–201

Britt, A., Welch, C., Katz, A., Iambana, B., Porton, I., Junge, R., ... Haring, D. 2004. The re-stocking of captive-bred ruffed lemurs (*Varecia variegata variegata*) into the Betampona Reserve, Madagascar: methodology and recommendations. *Biodiversity and Conservation*, 13:635–657. https://doi.org/10.1023/b:bioc.0000009497.24917.ae

Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Vera Candioti, J., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F. & Bahl, M. F. 2020. Frog body condition: basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. *Ecological Indicators*, 112, art. 106098. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106098

Brown, G. P., Kelehear, C., Shilton, C. M., Phillips, B. L. & Shine, R. 2015. Stress and immunity at the invasion front: a comparison across cane toad (*Rhinella marina*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 116:748–760. https://doi.org/10.1111/bij.12623

Bruňanská, M., Matey, V. & Nebesářová, J. 2012. Ultrastructure of the spermatozoon of the diphyllobothriidean cestode *Cephalochlamys namaquensis* (Cohn, 1906). *Parasitology Research*, 111:1037–1043. https://doi.org/10.1007/s00436-012-2928-4

Bürkner, P.-C. 2017. brms: an R package for Bayesian multilevel models using Stan. *Journal of Statistical Software*, 80:1–28. https://doi.org/10.18637/jss.v080.i01

Burnham, K. P. & Anderson, D. R. 2002. *Model selection and multi-model inference: A practical information-theoretic approach*. 2nd ed. New York, USA: Springer-Verlag.

Bursey, C. R., Goldberg, S. R., Kusamba, C. & Greenbaum, E. 2018. New species of *Falcaustra* (Nematoda: Kathlaniidae) and other helminths in *Amietia nutti* (Anura: Pyxicephalidae) from the Democratic Republic of Congo. *Comparative Parasitology*, 85:177–181. https://doi.org/10.1654/1525-2647-85.2.177

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M. & Shostak, A. W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, 83:575–583. https://doi.org/10.2307/3284227

Caffara, M., Locke, S. A., Cristanini, C., Davidovich, N., Markovich, M. P. & Fioravanti, M. L. 2016. A combined morphometric and molecular approach to identifying metacercariae of *Euclinostomum heterostomum* (Digenea: Clinostomidae). *The Journal of Parasitology*, 102:239–248. https://doi.org/10.1645/15-823

Cailliez, F. 1983. The analytical solution of the additive constant problem. *Psychometrika*, 48:305–310. https://doi.org/10.1007/bf02294026

Cameron, S. L. 2014. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 59:95–117. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162007

Campião, K., da Silva, R. & Ferreira, V. 2012. Helminth parasite communities of allopatric populations of the frog *Leptodactylus podicipinus* from Pantanal, Brazil. *Journal of Helminthology*, 88:13–19. https://doi.org/10.1017/s0022149x12000557

Campião, K. M., de Aquino Ribas, A. C., Morais, D. H., da Silva, R. J. & Tavares, L. E. R. 2015. How many parasites species a frog might have? Determinants of parasite diversity in South American anurans. *PLOS One*, 10, e0140577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140577

Canel, D., Levy, E., Alarcos, A. J., Braicovich, P. E., Cantatore, D. M. P., Irigoitia, M. M., ... Timi, J. T. 2019. Distribution patterns of two species of *Corynosoma* (Acanthocephala: Polymorphidae) in fishes from Southwestern Atlantic. *Parasitology Research*, 118:2831–2841. https://doi.org/10.1007/s00436-019-06440-5

Capinha, C., Essl, F., Seebens, H., Moser, D. & Pereira, H. M. 2015. The dispersal of alien species redefines biogeography in the Anthropocene. *Science*, 348:1248–1251. https://doi.org/10.1126/science.aaa8913

Carpenter, B., Gelman, A., Hoffman, M., Lee, D., Goodrich, B., Betancourt, M., ... Ridell, A. 2017. Stan: a probabilistic programming language. *Journal of Statistical Software*, 76:1–32. https://doi.org/10.18637/jss.v076.i01

Carreno, R. & Nadler, S. A. 2003. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 89:965–973. https://doi.org/10.1645/ge-76r

Castillo, C., Lobos, G., González-Acuña, D., Moreno, L., González, C. E. & Landaeta-Aqueveque, C. 2017. First parasitological study of the African clawed frog (*Xenopus laevis*, Amphibia) in Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26:243–247. https://doi.org/10.1590/s1984-29612017029

Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M. & Palmer, T. M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1, e1400253. https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253

Chaabane, A., Verneau, O. & du Preez, L. H. 2019. *Indopolystoma* n. gen. (Monogenea, Polystomatidae) with the description of three new species and reassignment of eight known *Polystoma* species from Asian frogs (Anura, Rhacophoridae). *Parasite*, 26, art. 67. https://doi.org/10.1051/parasite/2019067

Chan, P. P. & Lowe, T. M. 2019. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1962:1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. 2018. fastp: an ultra-fast aill-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34:i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560

Chernomor, O., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. 2016. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic Biology*, 65:997–1008. https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037

Chinchio, E., Crotta, M., Romeo, C., Drewe, J. A., Guitian, J. & Ferrari, N. 2020. Invasive alien species and disease risk: an open challenge in public and animal health. *PLOS Pathogens*, 16, e1008922. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008922

Christin, M.-S., Gendron, A. D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D. J., Cyr, D., ... Fournier, M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:1127–1133. https://doi.org/10.1002/etc.5620220522

Clarke, K. R., Somerfield, P. J. & Chapman, M. G. 2006. On resemblance measures for ecological studies, including taxonomic dissimilarities and a zero-adjusted Bray–Curtis coefficient for denuded assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 330:55–80. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.12.017

Clavero, M., Nores, C., Kubersky-Piredda, S., & Centeno-Cuadros, A. 2016. Interdisciplinarity to reconstruct historical introductions: solving the status of cryptogenic crayfish. *Biological Reviews*, 91:1036–1049. https://doi.org/10.1111/brv.12205

Coates, A., Barnett, L. K., Hoskin, C. & Phillips, B. L. 2017. Living on the edge: parasite prevalence changes dramatically across a range edge in an invasive gecko. *The American Naturalist*, 189:178–183. https://doi.org/10.1086/689820

Cohen, N., Effridge, N. J., Parsons, S. C. V., Rollins-Smith, L. A., Nagata, S. & Albright, D. 1984. Identification and treatment of a lethal nematode (*Capillaria xenopodis*) infestation in the South African frog, *Xenopus laevis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 8:739–741

Cohn, L. 1906. Zur Anatomie zweier Cestoden. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 40:362–367

Comas, M. & Ribas, A. 2013. Why are the prevalence and diversity of helminths in the endemic Pyrenean brook newt *Calotriton asper* (Amphibia, Salamandridae) so low? *Journal of Helminthology*, 89:175–181. https://doi.org/10.1017/s0022149x13000710

Cone, D. K., Marcogliese, D. J. & Watt, W. D. 1993. Metazoan parasite communities of yellow eels (*Anguilla rostrata*) in acidic and limed rivers of Nova Scotia. *Canadian Journal of Zoology*, 71:177–184. https://doi.org/10.1139/z93-024

Cook, J. A., Galbreath, K. E., Bell, K. C., Campbell, M. L., Carrière, S., Colella, J. P., ... Hoberg, E. P. 2017. The Beringian Coevolution Project: holistic collections of mammals

and associated parasites reveal novel perspectives on evolutionary and environmental change in the North. *Arctic Science*, 3:585–617. https://doi.org/10.1139/as-2016-0042

Coon, C. A. C. & Martin, L. B. 2014. Patterns of haemosporidian prevalence along a range expansion in introduced Kenyan house sparrows *Passer domesticus*. *Journal of Avian Biology*, 45:34–42. https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00235.x

Cosgrove, G. E. & Jared, D. W. 1974. Diseases and parasites of *Xenopus*, the Clawed Toad. In: Amborski, R. L., Hood, M. A. & Miller, R. R., eds. *Conference proceedings*. Gulf Coast Regional Symposium on Diseases of Aquatic Animals, Center for Wetland Resources. Baton Rouge, LA: Louisiana State University. pp. 225–242.

Cosgrove, G. E. & Jared, D. W. 1977. Treatment of skin-invading capillariid nematode in a colony of South African Clawed Frog (*Xenopus laevis*). *Laboratory Animal Science*, 27:526–526

Courant, J., Adil, L., de Kegel, B., Adriaens, D. & Herrel, A. 2019a. Conserved growth rate and age structure of *Xenopus laevis* in the edge and core of an expanding population. *Biological Journal of the Linnean Society*, 128:122–129. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz088

Courant, J., Secondi, J., Bereiziat, V. & Herrel, A. 2017. Resources allocated to reproduction decrease at the range edge of an expanding population of an invasive amphibian. *Biological Journal of the Linnean Society*, 122:157–165. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx048

Courant, J., Secondi, J., Guillemet, L., Vollette, E. & Herrel, A. 2019b. Rapid changes in dispersal on a small spatial scale at the range edge of an expanding population. *Evolutionary Ecology*, 33:599–612. https://doi.org/10.1007/s10682-019-09996-x

Courant, J., Vollette, E., Secondi, J. & Herrel, A. 2018. Changes in the aquatic macroinvertebrate communities throughout the expanding range of an invasive anuran. *Food Webs*, 17, e00098. https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00098

Crayon, J. J. 2005. Species account: *Xenopus laevis*. In: Lannoo, M. J., ed. *Amphibian declines: the conservation status of United States species*. Berkeley: University of California Press. pp. 522–525.

Criscione, C. D., Cooper, B. & Blouin, M. S. 2006. Parasite genotypes identify source populations of migratory fish more accurately than fish genotypes. *Ecology*, 87:823–828. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[823:pgispo]2.0.co;2

Cronin, J. T. & Reeve, J. D. 2005. Host-parasitoid spatial ecology: a plea for a landscape-level synthesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272:2225–2235. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3286

Crous, H. P. & du Preez, L. H. 1997. Morphology of *Gyrdicotylus gallieni* Vercammen-Grandjean, 1960 (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Xenopus laevis* (Daudin, 1803). *Proceedings of the Microscopy Society of Southern Africa*, 27:117

Cruz, M. J., Rebelo, R. & Crespo, E. G. 2006. Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of south-western Iberian amphibians in their breeding habitats. *Ecography*, 29:329–338. https://doi.org/10.1111/j.2006.0906-7590.04333.x

Crystal-Ornelas, R. & Lockwood, J. L. 2020. The 'known unknowns' of invasive species impact measurement. *Biological Invasions*, 22:1513–1525. https://doi.org/10.1007/s10530-020-02200-0

Csárdi, G. & Nepusz, T. 2006. The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems*, 1695:1–9

Daszak, P. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science*, 287:443–449. https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443

de Busschere, C., Courant, J., Herrel, A., Rebelo, R., Rödder, D., Measey, G. J. & Backeljau, T. 2016. Unequal contribution of native South African phylogeographic lineages to the invasion of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in Europe. *PeerJ*, 4, e1659. https://doi.org/10.7717/peerj.1659

de Puytorac, P. D. & Grain, J. 1965. Structure et ultrastructure de *Balantidium xenopi* sp. nov. Cilié trichostome parasite du batracien *Xenopus fraseri* Boul. *Protistologica*, 1:29–36

de Villiers, F. A. & Measey, G. J. 2017. Overland movement in African clawed frogs (*Xenopus laevis*): empirical dispersal data from within their native range. *PeerJ*, 5, e4039. https://doi.org/10.7717/peerj.4039

Dick, R. I. 1959. Preliminary notes on the relationships existing between the leech, *Marsupiobdella africana*, the river-crab, *Potamon perlatus*, and the platanna, *Xenopus laevis*, as observed in specimens taken from the Kromboom River in the Cape Province of the Union of South Africa. *Journal of the Scientific Society of Cape Town*, 2:47–49

Dierckxsens, N., Mardulyn, P. & Smits, G. 2017. NOVOPlasty: *de novo* assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nuclei Acids Research*, 45, e18. https://doi.org/10.1093/nar/gkw955

Dijkstra, E. W. 1959. A note on two problems in connexion with graphs. *Numerische Mathematik*, 1:269–271. https://doi.org/10.1007/bf01386390

Dlugosch, K. M. & Parker, I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17:431–449. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x

Dollfus, R. P. 1968. Presence insolité chez un urodele et en Afrique du nord d'un *Cephalochlamys* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 39:1192–1201

du Preez, L. H., Badets, M., Héritier, L. & Verneau, O. 2017. Tracking platyhelminth parasite diversity from freshwater turtles in French Guiana: first report of *Neopolystoma* Price, 1939 (Monogenea: Polystomatidae) with the description of three new species. *Parasites & Vectors*, 10, art. 53. https://doi.org/10.1186/s13071-017-1986-y

du Preez, L. H., Crous, H. P. & Kok, D. J. 1996. Morphology of an unknown cyclophyllidean cysticercoid found in the Clawed Frog, *Xenopus laevis*. *Proceedings of the Microscopy Society of Southern Africa*, 26:111

du Preez, L. H., Kunene, N., Hanner, R., Giesy, J. P., Solomon, K. R., Hosmer, A. & van der Kraak, G. J. 2009. Population-specific incidence of testicular ovarian follicles in *Xenopus laevis* from South Africa: a potential issue in endocrine testing. *Aquatic Toxicology*, 95:10–16. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.018

du Preez, L. H., Rahariviololoniaina, L., Verneau, O. & Vences, M. 2019. A new genus of polystomatid parasitic flatworm (Monogenea: Polystomatidae) without free-swimming life stage from the Malagasy poison frogs. *Zootaxa*, 2722:54–68. https://doi.org/10.11646/zootaxa.2722.1.2

du Preez, L. H. & van Wyk, A. 2007. *Bios: an integrated approach to life sciences teaching and learning*. Pretoria: Mediakor.

du Preez, L. H. & Verneau, O. 2020. Eye to eye: classification of conjunctival sac polystomes (Monogenea: Polystomatidae) revisited with the description of three new genera *Apaloneotrema* n. g., *Aussietrema* n. g. and *Fornixtrema* n. g. *Parasitology Research*, 119:4017–4031. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06888-w

Duane, S., Kennedy, A. D., Pendleton, B. J. & Roweth, D. 1987. Hybrid Monte Carlo. *Physics Letters B*, 195:216–222. https://doi.org/10.1016/0370-2693(87)91197-x

Dufresnes, C., Santo, L. D., Leuenberger, J., Schuerch, J., Mazepa, G., Grandjean, N., ... Dubey, S. 2017. Cryptic invasion of Italian pool frogs (*Pelophylax bergeri*) across Western Europe unraveled by multilocus phylogeography. *Biological Invasions*, 19:1407–1420. https://doi.org/10.1007/s10530-016-1359-z

Dunn, A. M. & Hatcher, M. J. 2015. Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. *Trends in Parasitology*, 31:189–199. https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.003

Dunn, A. M., Torchin, M. E., Hatcher, M. J., Kotanen, P. M., Blumenthal, D. M., Byers, J. E., ... Fox, C. 2012. Indirect effects of parasites in invasions. *Functional Ecology*, 26:1262–1274. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02041.x

Dunn, P. K. & Smyth, G. K. 2005. Series evaluation of Tweedie exponential dispersion models densities. *Statistics and Computing*, 15:267–280. https://doi.org/10.1007/s11222-005-4070-y

Elephandt, A., Eistetter, I., Fleig, A., Günther, E., Hainich, M., Hepperle, S. & Traub, B. 2000. Hearing threshold and frequency discrimination in the purely aquatic frog *Xenopus laevis* (Pipidae): measurement by means of conditioning. *The Journal of Experimental Biology*, 203:3621–3629

Elkan, E. & Murray, R. W. 1952. A larval trematode infection of the lateral line system of the Toad *Xenopus laevis* (Daudin). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 122:121–126. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1952.tb06314.x

Ellis, E. C., Antill, E. C. & Kreft, H. 2012. All is not loss: plant biodiversity in the Anthropocene. *PLOS One*, 7, e30535. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030535

Ellison, A. M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters*, 7:509–520. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00603.x

Elton, C. 1958. *The ecology of invasions by animals and plants*. London, UK: Methuen.

Engemann, K., Enquist, B. J., Sandel, B., Boyle, B., Jørgensen, P. M., Morueta-Holme, N., ... Svenning, J. C. 2015. Limited sampling hampers ”big dataëstimation of species richness in a tropical biodiversity hotspot. *Ecology and Evolution*, 5:807–820. https://doi.org/10.1002/ece3.1405

Erpenbeck, D., Voigt, O., Wörheide, G. & Lavrov, D. V. 2009. The mitochondrial genomes of sponges provide evidence for multiple invasions by Repetitive Hairpin-forming Elements (RHE). *BMC Genomics*, 10, art. 591. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-591

Evans, B. J., Carter, T. F., Tobias, M. L., Kelley, D. B., Hanner, R. & Tinsley, R. C. 2008. A new species of clawed frog (genus *Xenopus*) from the Itombwe Massif, Democratic Republic of the Congo: implications for DNA barcodes and biodiversity conservation. *Zootaxa*, 1780:55–68. https://doi.org/10.11646/zootaxa.1780.1.2

Evans, B. J., Kelley, D. B., Tinsley, R. C., Melnick, D. J. & Cannatella, D. C. 2004. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33:197–213. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.018

Evans, M. & Jang, G. H. 2011. Weak informativity and the information in one prior relative to another. *Statistical Science*, 26:423–439. https://doi.org/10.1214/11-sts357

Feldman, S. H. & Ramirez, M. P. 2014. Molecular phylogeny of *Pseudocapillaroides xenopi* (Moravec *et* Cosgrove, 1982) and development of a quantitative PCR assay for its detection in aquarium sediment. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53:668–674

Ferguson, R. R. & Appleton, C. C. 1988a. Some aspects of the morphology, population structure and larval biology of *Cephalochlamys namaquensis* (Cestoda: Diphyllidea), a parasite of the Clawed Toad, *Xenopus laevis*. *South African Journal of Zoology*, 23:117–123. https://doi.org/10.1080/02541858.1988.11448087

Ferguson, R. R. & Appleton, C. C. 1988b. The tapeworm *Cephalochlamys namaquensis* (Pseudophyllidea) in a population of Clawed Toad, *Xenopus laevis*, in Natal. *South African Journal of Science*, 84:140

Ferrari, N., Citterio, C. V. & Lanfranchi, P. 2016. Infracommunity crowding as an individual measure of interactive-isolationist degree of parasite communities: disclosing the effects of extrinsic and host factors. *Parasites & Vectors*, 9, art. 88. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1371-2

Ferris, V. R. & Ferris, J. M. 1989. Why ecologists need systematics: importance of systematics to ecological research. *Journal of Nematology*, 21, art. 308

Fick, S. E. & Hijmans, R. J. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37:4302–4315. https://doi.org/10.1002/joc.5086

Fischer, W., Koch, W. & Elepfandt, A. 2000. Sympatry and hybridization between the clawed frogs *Xenopus laevis laevis* and *Xenopus muelleri* (Pipidae). *Journal of Zoology*, 252:99–107. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb00824.x

Fischthal, J. H. & Thomas, J. D. 1968. Digenetic trematodes of amphibians and reptiles from Ghana. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 35:1–15

Fitzpatrick, B., Fordyce, J., Niemiller, M. & Reynolds, R. G. 2012. What can DNA tell us about biological invasions? *Biological Invasions*, 14:245–253. https://doi.org/10.1007/s10530-011-0064-1

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:294–299

Fouquet, A. 2001. Des clandestins aquatiques. *Zamenis*, 6:10–11

Fouquet, A. & Measey, G. J. 2006. Plotting the course of an African clawed frog invasion in Western France. *Animal Biology*, 56:95–102. https://doi.org/10.1163/157075606775904722

Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28:3150–3152. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565

Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. & Hausser, J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*, 13:31–46. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025568

Furman, B. L., Bewick, A. J., Harrison, T. L., Greenbaum, E., Gvozdik, V., Kusamba, C. & Evans, B. J. 2015. Pan-African phylogeography of a model organism, the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Molecular Ecology*, 24:909–925. https://doi.org/10.1111/mec.13076

Gabry, J., Simpson, D., Vehtari, A., Betancourt, M. & Gelman, A. 2019. Visualization in Bayesian workflow. *Journal of the Royal Statictical Society: Series A*, 182:389–402. https://doi.org/10.1111/rssa.12378

Galazzo, D. E., Dayanandan, S., Marcogliese, D. J. & McLaughlin, J. D. 2002. Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA sequence data and comparisons with European congeners. *Canadian Journal of Zoology*, 80:2207–2217. https://doi.org/10.1139/Z02-198

Galbreath, K. E., Toman, H. M., Li, C. & Hoberg, E. P. 2020. When parasites persist: tapeworms survive host extinction and reveal waves of dispersal across Beringia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287, art. 20201825. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1825

Gelman, A. 2006. Prior distributions for variance parameters in hierarchical models. *Bayesian Analysis*, 1:515–533. https://doi.org/10.1214/06-ba117a

Gelman, A., Goodrich, B., Gabry, J. & Vehtari, A. 2019. R-squared for Bayesian regression models. *The American Statistician*, 73:307–309. https://doi.org/10.1080/00031305.2018.1549100

Gelman, A. & Hill, J. K. 2006. *Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models*. New York: Cambridge University Press.

Gelman, A., Jakulin, A., Pittau, M. G. & Su, Y.-S. 2008. A weakly informative default prior distribution for logistic and other regression models. *The Annals of Applied Statistics*, 2:1360–1383. https://doi.org/10.1214/08-aoas191

Gilks, W. R., Richardson, S. & Spiegelhalter, D. J., eds. 1996. *Markov Chain Monte Carlo in Practice*. London: Chapman & Hall.

Gómez, A. & Nichols, E. 2013. Neglected wild life: parasitic biodiversity as a conservation target. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2:222–227. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.07.002

Greiner, S., Lehwark, P. & Bock, R. 2019. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47:W59–W64. https://doi.org/10.1093/nar/gkz238

Grohovaz, G. S., Harley, E. & Fabian, B. 1996. Significant mitochondrial DNA sequence divergence in natural populations of *Xenopus laevis* (Pipidae) from South Africa. *Herpetologica*, 52:247–253. https://doi.org/10.1080/11250003.2013.847502

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R. & Hofacker, I. L. 2008. The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*, 36:W70–W74. https://doi.org/10.1093/nar/gkn188

Gu, X., Fu, Y. X. & Li, W. H. 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Molecular Biology and Evolution*, 12:546–557. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040235

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59:307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010

Gundale, M. J., Pauchard, A., Langdon, B., Peltzer, D. A., Maxwell, B. D. & Nuñez, M. A. 2014. Can model species be used to advance the field of invasion ecology? *Biological Invasions*, 16:591–607. https://doi.org/10.1007/s10530-013-0610-0

Guo, Q. & Ricklefs, R. E. 2010. Domestic exotics and the perception of invasibility. *Diversity and Distributions*, 16:1034–1039. https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2010.00708.x

Gupta, V. & Bakshi, R. 1984. Nematode parasites of fishes IV. On two new ascarids, *Ascaridia seenghali* n. sp. and *Paraquimperia xenentodonia* n. sp., from freshwater fishes of India. *Indian Journal of Helminthology*, 36:55–60

Gurdon, J. B. & Hopwood, N. 2000. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *The International Journal of Developmental Biology*, 44:43–50 http://www.ijdb.ehu.es/web/descarga/paper/10761846

Hahn, C., Bakke, T. A., Bachmann, L., Weiss, S. & Harris, P. D. 2011. Morphometric and molecular characterization of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae) from an Austrian brown trout population. *Parasitology International*, 60:480–487. https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.08.016

Hahn, C., Weiss, S. J., Stojanovski, S. & Bachmann, L. 2015. Co-speciation of the ectoparasite *Gyrodactylus teuchis* (Monogenea, Platyhelminthes) and its salmonid hosts. *PLOS One*, 10, e0127340. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127340

Halajian, A., Bursey, C. R., Goldberg, S. R. & Luus-Powell, W. 2013. Helminths of six species of anurans from the Republic of South Africa: *Amietophrynus garmani*, *Amietophrynus gutturalis*, *Amietophrynus maculatus*, *Schismaderma carens* (Bufonidae), *Amietia angolensis*, and *Strongylopus grayii* (Pyxicephalidae), with a review of South African anuran helminths. *Comparative Parasitology*, 80:80–95. https://doi.org/10.1654/4599.1

Hamann, M., González, C. & Kehr, A. 2006. Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. *Acta Parasitologica*, 51:294–299. https://doi.org/10.2478/s11686-006-0045-1

Hanek, G. & Molnar, K. 1974. Parasites of freshwater and anadromous fishes from Matamek River system, Quebec. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31:1135–1139

Hanek, G. & Threlfall, W. 1970. Metazoan parasites of the American eel (*Anguilla rostrata* (LeSueur)) in Newfoundland and Labrador. *Canadian Journal of Zoology*, 48:597–600

Harris, P. & Tinsley, R. C. 1987. The biology of *Gyrdicotylus gallieni* (Gyrodactylidea), an unusual vivparous monogenean from the African Clawed Toad, *Xenopus laevis*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 212:325–346. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb05993.x

Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E., ... Inger, R. 2018. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ*, 6, e4794. https://doi.org/10.7717/peerj.4794

Hartson, R. B., Orlofske, S. A., Melin, V. E., Dillon, R. T. & Johnson, P. T. J. 2011. Land use and wetland spatial position jointly determine amphibian parasite communities. *EcoHealth*, 8:485–500. https://doi.org/10.1007/s10393-011-0715-9

Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22:160–174. https://doi.org/10.1007/BF02101694

Heger, T. & Jeschke, J. M. 2014. The enemy release hypothesis as a hierarchy of hypotheses. *Oikos*, 123:741–750. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.01263.x

Hering-Hagenbeck, S. F. B. N. & Boomker, J. 2000. A check-list on the nematode parasites of South African Serpentes (snakes) and Sauria (lizards). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 67:1–13

Héritier, L., Badets, M., du Preez, L. H., Aisien, M. S., Lixian, F., Combes, C. & Verneau, O. 2015. Evolutionary processes involved in the diversification of chelonian and mammal polystomatid parasites (Platyhelminthes, Monogenea, Polystomatidae) revealed by palaeoecology of their hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92:1–10. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.05.026

Héritier, L., Valdeón, A., Sadaoui, A., Gendre, T., Ficheux, S., Bouamer, S., ... Verneau, O. 2017. Introduction and invasion of the red-eared slider and its parasites in freshwater ecosystems of Southern Europe: risk assessment for the European pond turtle in wild environments. *Biodiversity and Conservation*, 26:1817–1843. https://doi.org/10.1007/s10531-017-1331-y

Héritier, L., Verneau, O., Smith, K. G., Coetzer, C. & du Preez, L. H. 2018. Demonstrating the value and importance of combining DNA barcodes and discriminant morphological characters for polystome taxonomy (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology International*, 67:38–46. https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.03.002

Hill, J. E., Lawson, K. M. & Tuckett, Q. M. 2017. First record of a reproducing population of the African clawed frog *Xenopus laevis* Daudin, 1802 in Florida (USA). *BioInvasions Records*, 6:87–94. https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.1.14

Hiller, A. & Lessios, H. A. 2017. Phylogeography of *Petrolisthes armatus*, an invasive species with low dispersal ability. *Scientific Reports*, 7, 3359. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03410-8

Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. & Vinh, L. S. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35:518–522. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281

Hofacker, I. L., Fekete, M. & Stadler, P. F. 2002. Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. *Journal of Molecular Biology*, 319:1059–1066. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00308-X

Hoffman, M. D. & Gelman, A. 2014. The No-U-Turn Sampler: adaptively setting path lengths in Hamiltonian Monte Carlo. *The Journal of Machine Learning Research*, 15:1593–1623

Hope, R. M. 2013. Rmisc: Ryan Miscellaneous. R Package version 1.5. https://doi.org/https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc

Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L. & Li, W. 2010. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, 26:680–682. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003

Hutchinson, M. C., Cagua, E. F., Balbuena, J. A., Stouffer, D. B., Poisot, T. & Fitzjohn, R. 2017. paco: implementing Procrustean approach to cophylogeny in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 8:932–940. https://doi.org/10.1111/2041-210x.12736

Huyse, T., Buchmann, K. & Littlewood, D. T. J. 2008. The mitochondrial genome of *Gyrodactylus derjavinoides* (Platyhelminthes: Monogenea): a mitogenomic approach for *Gyrodactylus* species and strain identification. *Gene*, 417:27–34. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.03.008

Huyse, T., Oeyen, M., Larmuseau, M. H. D. & Volckaert, F. A. M. 2017. Co-phylogeographic study of the flatworm *Gyrodactylus gondae* and its goby host *Pomatoschistus minutus*. *Parasitology International*, 66:119–125. https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.008

Huyse, T., Plaisance, L., Webster, B. L., Mo, T. A., Bachmann, L. & Littlewood, D. T. J. 2007. The mitochondrial genome of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes: Monogenea), a

pathogen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, 134:739–747. https://doi.org/10.1017/S0031182006002010

Huyse, T., Vanhove, M. P. M., Mombaerts, M., Volckaert, F. A. M. & Verreycken, H. 2015. Parasite introduction with an invasive goby in Belgium: double trouble? *Parasitology Research*, 114:2789–2793. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4544-6

Ihlow, F., Courant, J., Secondi, J., Herrel, A., Rebelo, R., Measey, G. J., ... Rödder, D. 2016. Impacts of climate change on the global invasion potential of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *PLOS One*, 11, e0154869. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154869

Ivanova, N. V., Dewaard, J. R. & Hebert, P. D. N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6:998–1002. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x

Ivashkin, V. M. & Khromova, L. A. 1976. Cucullanata and Gnathostomata of animals and man and the diseases caused by them. Vol. 27, *Osnovy Nematodologii*. Moskow: Nauka. pp. 436.

Jabbar, A., Fong, R. W. J., Kok, K. W., Lopata, A. L., Gasser, R. B. & Beveridge, I. 2013. Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13 species of fish from Western Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 161:247–253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.012

Jackson, H. C. & Tinsley, R. C. 1988. Environmental influences on egg production by the monogenean *Protopolystoma xenopodis*. *Parasitology*, 97:115–128. https://doi.org/10.1017/S0031182000066798

Jackson, J. A. 2000. Two new *Falcaustra* Lane, 1915 species (Nematoda: Kathlaniidae) from African pipids (Anura). *Journal of Natural History*, 34:663–677. https://doi.org/10.1080/002229300299336

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 1995a. Evolutionary relationships, host range and geographical distribution of *Camallanus* Railliet & Henry, 1915 species (Nematoda: Camallaninae) from clawed toads of the genus *Xenopus* (Anura: Pipidae). *Systematic Parasitology*, 32:1–21. https://doi.org/10.1007/BF00009463

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 1995b. Representatives of *Batrachocamallanus* n. g. (Nematoda: Procamallaninae) from *Xenopus* spp. (Anura: Pipidae): geographical distribution, host range and evolutionary relationships. *Systematic Parasitology*, 31:159–188. https://doi.org/10.1007/BF00009115

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 1997. The taxonomic status, host range and geographic distribution of *Dollfuschella* Vercammen-Grandjean, 1960 (Digenea: Halipeginae) from *Xenopus* spp. (Anura: Pipidae). *Systematic Parasitology*, 36:1–11. https://doi.org/10.1023/A:1005716503218

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 1998a. Incompatibility of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) with an octoploid *Xenopus* species from southern Rwanda. *International Journal for Parasitology*, 28:1195–1199. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00065-4

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 1998b. Paramphistome digeneans from *Xenopus* species (Pipidae) in Africa: taxonomy, host-specificity and biogeography. *Systematic Parasitology*, 40:143–160. https://doi.org/10.1023/A:1005936429562

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 2001a. Host-specificity and distribution of cephalochlamydid cestodes: correlation with allopolyploid evolution of pipid anuran hosts. *Journal of Zoology*, 254:405–419. https://doi.org/10.1017/S0952836901000905

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 2001b. *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea) primary and secondary infections in *Xenopus laevis*. *Parasitology*, 123:455–463. https://doi.org/10.1017/s0031182001008745

Jackson, J. A. & Tinsley, R. C. 2005. Geographic and within-population structure in variable resistance to parasite species and strains in a vertebrate host. *International Journal for Parasitology*, 25:29–37. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.017

Jackson, P. B. B. 1978. Health and disease in aquaculture. *Journal of the South African Veterinary Association*, 49:57–59

Jakob, E. M., Marshall, S. D. & Uetz, G. W. 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*, 77:61–67. https://doi.org/10.2307/3545585

Jeschke, J. M. 2014. General hypotheses in invasion ecology. *Diversity and Distributions*, 20:1229–1234. https://doi.org/10.1111/ddi.12258

Jia, W.-Z., Yan, H.-B., Guo, A.-J., Zhu, X.-Q., Wang, Y.-C., Shi, W.-G., ... Cai, X.-P. 2010. Complete mitochondrial genomes of *Taenia multiceps*, *T. hydatigena* and *T. pisiformis*: additional molecular markers for a tapeworm genus of human and animal health significance. *BMC Genomics*, 11, art. 447. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-447

Jørgensen, B. 1997. *The Theory of Dispersion Models*. London: Chapman & Hall.

Jovani, R. & Tella, J. L. 2006. Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends in Parasitology*, 22:214–218. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.011

Jühling, F., Pütz, J., Bernt, M., Donath, A., M., M., Florentz, C. & Stadler, P. F. 2012. Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanisms of mitochondrial genome rearrangements. *Nucleic Acids Research*, 40:2833–2845. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1131

Junker, K., Boomker, J., Govender, D. & Mutafchiev, Y. 2019. Nematodes found in Nile crocodiles in the Kruger National Park, South Africa, with redescriptions of *Multicaecum agile* (Wedl, 1861) (Heterocheilidae) and *Camallanus kaapstaadi* Southwell & Kirshner, 1937 (Camallanidae). *Systematic Parasitology*, 96:381–398. https://doi.org/10.1007/s11230-019-09856-w

Kalous, L., Musil, J., Petrtỳl, M., Vajglová, T., Romočuskỳ, Š. & Bušta, L. 2013. The danger in the anglers' bucket: qualitative and quantitative insight into bait fish market in Prague (Czech Republic). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 77:27–35

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. & Jermiin, L. S. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14:587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Kamiya, T., O'Dwyer, K., Nakagawa, S. & Poulin, R. 2014. What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts. *Biological Reviews*, 89:123–134. https://doi.org/10.1111/brv.12046

Kang, S., Kim, J., Lee, J., Kim, S., Min, G.-S. & Park, J.-K. 2012. The complete mitochondrial genome of an ectoparasitic monopisthocotylean fluke *Benedenia hoshinai* (Monogenea: Platyhelminthes). *Mitochondrial DNA*, 23:176–178. https://doi.org/10.3109/19401736.2012.668900

Karlsen, B. O., Emblem, Å., Jørgensen, T. E., Klingan, K. A., Nordeide, J. T., Moum, T. & Johansen, S. D. 2014. Mitogenome sequence variation in migratory and stationary ecotypes of North-east Atlantic cod. *Marine Genomics*, 15:103–108. https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.01.001

Karve, J. N. 1941. Some parasitic nematodes of fishes. I. *Journal of the University of Bombay*, 10:9–42

Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20:1160–1166. https://doi.org/10.1093/bib/bbx108

Katoh, K. & Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Katoh, K. & Toh, H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporation structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics*, 9, art. 212. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-212

Kawato, S., Kobayashi, K., Shirakashi, S., Yanagi, S., Fukuda, Y., Yamashita, H., ... Kondo, H. 2019. Phylogenetic analysis with complete mitochondrial genome sequences of *Benedenia seriolae* specimens derived from Japanese *Seriola* spp. *Fish Pathology*, 54:27–33. https://doi.org/10.3147/jsfp.54.27

Keane, R. M. & Crawley, M. J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 17:164–170. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02499-0

Kelehear, C., Brown, G. P. & Shine, R. 2012. Rapid evolution of parasite life history traits on an expanding range-edge. *Ecology Letters*, 15:329–337. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01742.x

Kenny, N. J., Noreña, C., Damborenea, C. & and, C. G. 2019. Probing recalcitrant problems in polyclad evolution and systematics with novel mitochondrial genome resources. *Genomics*, 111:343–355. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.02.009

Kilian, J. V., Klauda, R. J., Widman, S., Kashiwagi, M., Bourquin, R., Weglein, S. & Schuster, J. 2012. An assessment of a bait industry and angler behavior as a vector of invasive species. *Biological Invasions*, 14:1469–1481. https://doi.org/10.1007/s10530-012-0173-5

Kim, J.-H., Lee, B.-S. & Jung, S.-J. 2020a. The complete mitochondrial genome of *Neoheterobothrium hirame* (Platyhelminthes: Monogenea) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mitochondrial DNA Part B*, 5:1408–1409. https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1735953

Kim, K.-H., Nam, U.-H., Kim, H. & Whang, I. 2020b. The complete mitochondrial genome of *Mazocraeoides gonialosae* (Platyhelminthes: Monogenea) from dotted gizzard shad, *Konosirus punctatus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 5:1570–1572. https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1742606

Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78:454–458. https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.454

King, K. C., McLaughlin, J. D., Boily, M. & Marcogliese, D. J. 2010. Effects of agricultural landscape and pesticides on parasitism in native bullfrogs. *Biological Conservation*, 143:302–310. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.10.011

King, K. C., McLaughlin, J. D., Gendron, A. D., Pauli, B. D., Giroux, I., Rondeau, B., ... Marcogliese, D. J. 2007. Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada. *Parasitology*, 134:2063–2080. https://doi.org/10.1017/s0031182007003277

King, P. H. & van As, J. G. 1992. Scanning electron microscopy of *Diplostomum* (*Tylodelphys*) *xenopodis* (Southwell & Kirshner, 1937) (Trematoda: Diplostomatidae). *Electron Microscopy Society of Southern Africa*, 22:127–128

King, P. H. & van As, J. G. 1997. Description of the adult and larval stages of *Tylodelphys xenopi* (Trematoda: Diplostomidae) from Southern Africa. *The Journal of Parasitology*, 83:287–295. https://doi.org/10.2307/3284458

King, P. H. & van As, J. G. 2000. Morphology and life history of *Petasiger variospinosus* (Trematoda: Echinostomatidae) in the Free State, South Africa. *The Journal of Parasitology*, 86:312–318. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0312:MALHOP]2.0.CO;2

Kmentová, N., Koblmüller, S., Van Steenberge, M., Raeymaekers, J. A., Artois, T., De Keyzer, E. L. R., ... Vanhove, M. P. 2020. Weak population structure and recent demographic expansion of the monogenean parasite *Kapentagyrus* spp. infecting clupeid fishes of Lake Tanganyika, East Africa. *International Journal for Parasitology*, 50:471–486. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.02.002

Kmentová, N., Van Steenberge, M., Raeymaekers, J. A. M., Kolbmüller, S., Hablützel, P., Bukinga, F. M., ... Vanhove, M. P. 2018. Monogenean parasites of sardines in Lake Tanganyika: diversity, origin and intraspecific variability. *Contributions to Zoology*, 87:105–132. https://doi.org/10.1163/18759866-08702004

Kmentová, N., Van Steenberge, M., van den Audenaerde, D. F. E. T., Nhiwatiwa, T., Bukinga, F. M., N'sibula, T. M., ... Vanhove, M. P. M. 2019. Co-introduction success of monogeneans infecting the fisheries target *Limnothrissa miodon* differs between two non-native areas: the potential of parasites as a tag for introduction pathway. *Biological Invasions*, 21:757–773. https://doi.org/10.1007/s10530-018-1856-3

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. & Wilson, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86:6196–6200

Køie, M. 1988. Parasites in European eel *Anguilla anguilla* (L.) from Danish freshwater, brackish and marine localities. *Ophelia*, 29:93–118

Kołodziej-Sobocińska, M., Brzeziński, M., Niemczynowicz, A. & Zalewski, A. 2018. High parasite infection level in non-native invasive species: it is just a matter of time. *Ecography*, 41:1283–1294. https://doi.org/10.1111/ecog.03362

Kruger, J., Basson, L. & van As, J. G. 1991. Redescription of *Trichodina xenopodos* Fantham, 1924 (Ciliophora: Peritrichida), a urinary bladder parasite of *Xenopus laevis laevis* Daudin, 1802, with notes on transmission. *Systematic Parasitology*, 19:43–50. https://doi.org/10.1007/BF00010301

Kruger, N. 2020. *Do vulnerable life stages of Xenopus laevis reduce its invasion potential?* Stellenbosch: Stellenbosch University and Université Claude Bernard Lyon 1. (Thesis – PhD).

Kruger, N. & du Preez, L. H. 2015. Reproductive strategies of the kangaroo leech, *Marsupiobdella africana* (Glossiphoniidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4:142–147. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.01.005

Kruger, N., Measey, J., Herrel, A. & Secondi, J. 2019. Anti-predator strategies of the invasive African clawed frog, *Xenopus laevis*, to native and invasive predators in western France. *Aquatic Invasions*, 14:433–443. https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.3.03

Kruschke, J. K. 2015. *Doing Bayesian Data Analysis: A Tutorial with R, JAGS, and Stan*. 2nd ed. London: Academic Press.

Kuhn, K., Streit, B. & Schwenk, K. 2008. Conservation of structural elements in the mitochondrial control region of *Daphnia*. *Gene*, 420:107–112. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.05.020

Kung, C. C. 1948. On some new species of spirurids from terrestrial vertebrates, with notes on *Habronema mansioni*, *Physaloptera paradoxa* and *Hartertia zuluensis*. *Journal of Helminthology*, 22:141–161

Kuperman, B. I., Matey, V. E., Fisher, R. N., Ervin, E. L., Warburton, M. L., Bakhireva, L. & Lehman, C. A. 2004. Parasites of the African Clawed Frog, *Xenopus laevis*, in Southern California, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 71:229–232. https://doi.org/10.1654/4112

Kuzmin, Y., Tkach, V. V., Snyder, S. D. & Bell, J. A. 2011. *Camallanus* Railliet *et* Henry, 1915 (Nematoda, Camallanidae) from Australian freshwater turtles with descriptions of two new species and molecular differentiation of known taxa. *Acta Parasitologica*, 56:213–226. https://doi.org/10.2478/s11686-011-0015-0

Laetsch, D. R., Heitlinger, E. G., Taraschewski, H., Nadler, S. A. & Blaxter, M. L. 2012. The phylogenetics of Anguillicolidae (Nematoda: Anguillicoloidea), swimbladder parasites of eels. *BMC Evolutionary Biology*, 12:60. https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-60

Lafferty, K. D. & Page, C. J. 1997. Predation on the endangered tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi*, by the introduced African clawed frog, *Xenopus laevis*, with notes on the frog's parasites. *Copeia*, 1997:589–592. https://doi.org/10.2307/1447564

Landman, W. J., Verneau, O., Raharivololoniaina, L. & du Preez, L. H. 2021. First record of *Metapolystoma* (Monogenea: Polystomatidae) from *Boophis* tree frogs in Madagascar, with the description of five new species. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14:161–178. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.01.012

Laslett, D. & Canbäck, B. 2008. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondiral nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 24:172–175. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm573

Le, T. H., Blair, D. & McManus, D. P. 2001. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*, 123:609–612. https://doi.org/10.1017/s0031182001008733

Le, T. H., Blair, D. & McManus, D. P. 2002a. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology*, 18:206–213. https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02252-3

Le, T. H., Pearson, M. S., Blair, D., Dai, N., Zhang, L. H. & McManus, D. P. 2002b. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 124:97–112. https://doi.org/10.1017/s0031182001008976

Lecomte, J.-B., Benoît, H. P., Ancelet, S., Etienne, M.-P., Bel, L. & Parent, E. 2013. Compound Poisson-gamma vs. delta-gamma to handle zero-inflated continuous data under a variable sampling volume. *Methods in Ecology and Evolution*, 4:1159–1166. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12122

Lee, C. E. & Gelembiuk, G. W. 2008. Evolutionary origins of invasive populations. *Evolutionary Applications*, 1:427–448. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00039.x

Lefoulon, E., Bain, O., Bourret, J., Junker, K., Guerrero, R., Cañizales, I., ... Martin, C. 2015. Shaking the tree: multi-locus sequence typing usurps current onchocercid (filarial nematode) phylogeny. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0004233. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004233

Legendre, P., Desdevises, Y. & Bazin, E. 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. *Systematic Biology*, 51:217–234. https://doi.org/10.1080/10635150252899734

Legendre, P. & Gallagher, E. D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129:271–280. https://doi.org/10.1007/s004420100716

Leigh, J. W. & Bryant, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6:1110–1116. https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410

Leiper, R. T. 1908. An account of some helminths contained in Dr. C.M. Wenyon's collection from the Sudan. *Report of the Wellcome Tropical Research Laboratories at the Gordon Memorial College, Khartoum*, 3:187–199

Lemoine, N. P. 2019. Moving beyond noninformative priors: why and how to choose weakly informative priors in Bayesian analyses. *Oikos*, 128:912–928. https://doi.org/10.1111/oik.05985

Lester, P. J., Bosch, P. J., Gruber, M. A., Kapp, E. A., Peng, L., Brenton-Rule, E. C., ... Wenseleers, T. 2015. No evidence of enemy release in pathogen and microbial communities of common wasps (*Vespula vulgaris*) in their native and introduced range. *PLOS One*, 10, e0121358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121358

Leung, T. L. F. & Koprivnikar, J. 2019. Your infections are what you eat: how host ecology shapes the helminth parasite communities of lizards. *Journal of Animal Ecology*, 88:416–426. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12934

Levinson, G. & Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4:203–221. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442

Li, R., Zhou, C., Ye, S., Men, L., Lui, Y. & Fu, S. 2019. Mitochondrial genome sequencing of the monogenean *Heterobothrium okamotoi* isolated from the tiger puffer *Takifugu rubripes* in North China. *Mitochondrial DNA Part B*, 4:3051–3052. https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1666671

Li, T., Yang, J., Li, Y., Cui, Y., Xie, Q., Bu, W. & Hillis, D. M. 2016. A mitochondrial genome of Rhyparochromidae (Hemiptera: Heteroptera) and a comparative analysis of related mitochondrial genomes. *Scientific Reports*, 6, art. 35175. https://doi.org/10.1038/srep35175

Li, W. & Godzik, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22:1658–1659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158

Lillo, F., Dufresnes, C., Faraone, F. P., Lo Valvo, M. & Stöck, M. 2013. Identification and potential origin of invasive clawed frogs *Xenopus* (Anura: Pipidae) in Sicily based on mitochondrial and nuclear DNA. *Italian Journal of Zoology*, 80:566–573. https://doi.org/10.1080/11250003.2013.847502

Lin, Y.-J., Jessop, B. M., Weyl, O. L. F., Iizuka, Y., Lin, S.-H. & Tzeng, W.-N. 2015. Migratory history of African longfinned eel *Anguilla mossambica* from Maningory River, Madagascar: discovery of a unique pattern in otolith Sr:Ca ratios. *Environmental Biology of Fishes*, 98:457–468. https://doi.org/10.1007/s10641-014-0275-2

Littlewood, D. T. J., Rohde, K. & Clough, K. A. 1997. Parasite speciation within or between host species? – Phylogenetic evidence from site-specific polystome monogeneans. *International Journal for Parasitology*, 27:1289–1297. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00086-6

Lloyd, M. 1967. Mean crowding. *Journal of Animal Ecology*, 36:1–30. https://doi.org/10.2307/3012

Lobos, G., Cattan, P., Estades, C. & Jaksic, F. M. 2013. Invasive African clawed frog *Xenopus laevis* in southern South America: key factors and predictions. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 48:1–12. https://doi.org/10.1080/01650521.2012.746050

Lobos, G. & Measey, G. J. 2002. Invasive populations of *Xenopus laevis* (Daudin) in Chile. *Herpetological Journal*, 12:163–168

Lobos, G., Mendez, M. A., Cattan, P. & Jaksic, F. 2014. Low genetic diversity of the successful invasive African clawed frog *Xenopus laevis* (Pipidae) in Chile. *Studies on*

Neotropical Fauna and Environment, 49:50–60. https://doi.org/10.1080/01650521.2014.912865

Locke, S. A., Levy, M. S., Marcogliese, D. J., Ackerman, S. & McLaughlin, J. D. 2012. The decay of parasite community similarity in ring-billed gulls *Larus delawarensis* and other hosts. *Ecography*, 35:530–538. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2011.07244.x

Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C. Stadler, P. F. & Hofacker, I. L. 2011. ViennaRNA package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6, art. 26. https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26

Louppe, V., Courant, J. & Herrel, A. 2017. Differences in mobility at the range edge of an expanding invasive population of *Xenopus laevis* in the west of France. *Journal of Experimental Biology*, 220:278–283. https://doi.org/10.1242/jeb.146589

Louppe, V., Courant, J., Videlier, M. & Herrel, A. 2018. Differences in standard metabolic rate at the range edge versus the center of an expanding invasive population of *Xenopus laevis* in the West of France. *Journal of Zoology*, 305:163–172. https://doi.org/10.1111/jzo.12548

Lowe, T. M. & Chan, P. P. 2016. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44:W54–W77. https://doi.org/10.1093/nar/gkw413

Lüdecke, D., Makowski, D., Waggoner, P. & Patil, I. 2020. performance: assessment of regression models performance. *CRAN*. https://doi.org/10.5281/zenodo.3952174

Lui, H. & Stiling, P. 2006. Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. *Biological Invasions*, 8:1535–1545. https://doi.org/10.1007/s10530-005-5845-y

Luque, J. L. & Poulin, R. 2007. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: hotspots and the geography of biodiversity. *Parasitology*, 134:865–878. https://doi.org/10.1017/S0031182007002272

Lymbery, A. J., Morine, M., Kanani, H. G., Beatty, S. J. & Morgan, D. L. 2014. Co-invaders: the effects of alien parasites on native hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3:171–177. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.04.002

MacCracken, J. G. & Stebbings, J. L. 2012. Test of a body condition index with amphibians. *Journal of Herpetology*, 46:346–350. https://doi.org/10.2307/23326905

Macey, J. R., Schulte, J. A., Larson, A. & Papenfuss, T. 1998. Tandem duplication via light-strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Molecular Biology and Evolution*, 15:71–75

Macnae, W., Rock, L. & Makowski, M. 1973. Platyhelminths from the South African Clawed Toad, or Platanna (*Xenopus laevis*). *Journal of Helminthology*, 47:199–235. https://doi.org/10.1017/S0022149X00023890

Madanire-Moyo, G. N., Luus-Powell, W. J. & Olivier, P. A. S. 2010. Ecology of metazoan parasites of *Clarias gariepinus* (Osteichthyes: Clariidae) from the Nwanedi-Luphephe Dams of the Limpopo River System, South Africa. *African Zoology*, 45:233–243. https://doi.org/10.3377/004.045.0202

Makowski, D., Ben-Shachar, M. & Lüdecke, D. 2019. bayestestR: describing effects and their uncertainty, existence and significance within the Bayesian framework. *Journal of Open Source Software*, 4, art. 1541. https://doi.org/10.21105/joss.01541

Mangiafico, S. 2020. rcompanion: functions to support extension education program evaluation. R package version 2.3.25. https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion

Manter, H. W. & Pritchard, M. H. 1964. Mission de zoologie médicale au Maniema (Congo, Leopoldville). *Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale*, 132:75–101

Marcogliese, D. J. & Cone, D. K. 1996. On the distribution and abundance of eel parasites in Nova Scotia: influence of pH. *The Journal of Parasitology*, 82:389–399. https://doi.org/10.2307/3284074

Marr, S. R., Mautz, W. J. & Hara, A. H. 2008. Parasite loss and introduced species: a comparison of the parasites of the Puerto Rican tree frog, (*Eleutherodactylus coqui*), in its native and introduced ranges. *Biological Invasions*, 10:1289–1298. https://doi.org/10.1007/s10530-007-9203-0

Marra, G. & Wood, S. N. 2011. Practical variable selection for generalized additive models. *Computational Statistics & Data Analysis*, 55:2372–2387. https://doi.org/10.1016/j.csda.2011.02.004

Martin, T. G., Wintle, B. A., Rhodes, J. R., Kuhnert, P. M., Field, S. A., Low-Choy, S. J., ... Possingham, H. P. 2005. Zero tolerance ecology: improving ecological inference by modelling the source of zero observations. *Ecology Letters*, 8:1235–1246. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00826.x

Marzal, A., Ricklefs, R. E., Valkiunas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., ... Bensch, S. 2011. Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLOS One*, 6, e21905. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021905

Mashego, S. N. 1989. Nematode parasites of *Barbus species* in Lebowa and Venda, South Africa. *South African Journal of Wildlife Research*, 19:35–37

Mashego, S. N. & Saayman, J. E. 1981. Observations on the prevalence of nematode parasites of the catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), in Lebowa, South Africa. *South African Journal of Wildlife Research*, 11:46–48

Mayer, M., Shine, R. & Brown, G. P. 2021. Rapid divergence of parasite infectivity and host resistance during a biological invasion. *Biological Journal of the Linnean Society*, 132:861–871. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa229

Mazzamuto, M. V., Galimberti, A., Cremonesi, G., Pisanu, B., Chapuis, J.-L., Stuyck, J., ... Martinoli, A. 2016. Preventing species invasion: a role for integrative taxonomy? *Integrative Zoology*, 11:214–228. https://doi.org/10.1111/1749-4877.12185

Mbokane, E. M., Theron, J. & Luus-Powel, W. J. 2020. Diversity of parasites from *Xenopus laevis* (Amphibia: Pipidae) and their seasonal rate of infection in selected habitats in the Limpopo Province, South Africa. *Helminthologia*, 57:252–267. https://doi.org/10.2478/helm-2020-0027

Mbokane, E. M., Theron, J. & Luus-Powell, W. J. 2015. Seasonal occurrence of some larval stages of endoparasites in three cyprinids from the Nwanedi-Luphephe dams, the Limpopo River System, South Africa. *Helminthologia*, 52:229–235. https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0037

McCarthy, M. A. & Masters, P. 2005. Profiting from prior information in Bayesian analyses of ecological data. *Journal of Applied Ecology*, 42:1012–1019. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01101.x

McElreath, R. 2020. *Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan*. 2nd ed. New York: Chapman & Hall/CRC.

McHugh, K. J., Weyl, O. L. F. & Smit, N. J. 2016. Parasites of fishes in the recently inundated ephemeral Lake Liambezi, Namibia. *African Journal of Aquatic Science*, 41:505–509. https://doi.org/10.2989/16085914.2016.1238338

Measey, G. J. 2004. *Xenopus laevis*. In: Minter, L., Burger, M., Harrison, J., Braack, H., Bishop, P. & Knoepfer, D., eds. *Atlas and Red Data Book of the Frogs of South Africa, Lesotho and Swaziland*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. pp. 264–265.

Measey, G. J. 2016. Overland movement in African clawed frogs (*Xenopus laevis*): a systematic review. *PeerJ*, 4, e2474. https://doi.org/10.7717/peerj.2474

Measey, G. J. & Channing, A. 2003. Phylogeography of the genus *Xenopus* in southern Africa. *Amphibia-Reptilia*, 24:321–330. https://doi.org/10.1163/156853803322440781

Measey, G. J. & Davies, S. J. 2011. Struggling against domestic exotics at the southern end of Africa. *Froglog*, 97:28–30

Measey, G. J., Davies, S. J., Vimercati, G., Rebelo, A., Schmidt, W. & Turner, A. 2017. Invasive amphibians in southern Africa: a review of invasion pathways. *Bothalia*, 47, a2117. https://doi.org/10.4102/abc.v47i2.2117

Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., ... Thirion, J. M. 2012. Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions*, 14:2255–2270. https://doi.org/10.1007/s10530-012-0227-8

Metcalf, M. M. 1923. The opalinid ciliate infusorians. *Bulletin of the United States National Museum*, 120:1–484

Mettrick, D. F. 1963. Some cestodes of reptiles and amphibians from the Rhodesias. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 141:239–250. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01610.x

Meyer, L., du Preez, L. H., Bonneau, E., Héritier, L., Quintana, M., Valdeón, A., ... Verneau, O. 2015. Parasite host-switching from the invasive American red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*, to the native Mediterranean pond turtle, *Mauremys leprosa*, in natural environments. *Aquatic Invasions*, 10:79–91. https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.08

Mihaljevic, J. R., Hoye, B. J. & Johnson, P. T. J. 2017. Parasite metacommunities: evaluating the roles of host community composition and environmental gradients in structuring symbiont communities within amphibians. *Journal of Animal Ecology*, 87:354–368. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12735

Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Conference proceedings*. 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE): Institute of Electrical and Electronics Engineers.

Mimee, B., Duceppe, M.-O., Véronneau, P.-Y., Lafond-Lapalme, J., Jean, M., Belzile, F. & Bélair, G. 2015. A new method for studying population genetics of cyst nematodes based on Pool-Seq and genomewide allele frequency analysis. *Molecular Ecology Resources*, 15:1356–1365. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12412

Minh, B. Q. Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler A. & Lanfear, R. 2020. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molocular Biology and Evolution*, 37:1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015

Mollaret, I., Jamieson, B. G. M. & Justine, J.-L. 2000. Phylogeny of the Monopisthocotylea and Polyopisthocotylea (Platyhelminthes) inferred from 28S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 30:171–185. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00197-6

Morais, P. & Reichard, M. 2018. Cryptic invasions: a review. *Science of the Total Environment*, 613–614:1438–1448. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.133

Morand, S., Bordes, F., Chen, H. W., Claude, J., Cosson, J. F., Galan, M., ... Ribas, A. 2015. Global parasite and *Rattus* rodent invasions: the consequences for rodent-borne diseases. *Integrative Zoology*, 10:409–423. https://doi.org/10.1111/1749-4877.12143

Moravec, F. 1966a. The finding of the nematode *Paraquimperia tenerrima* (v. Linstow, 1878) from eels *Anguilla anguilla* (L.) in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica*, 13:182–186

Moravec, F. 1966b. On the systematics of the genus *Paraquimperia* Baylis, 1934 (Nematoda: Quimperiidae). *Helminthologia*, 7:353–364

Moravec, F. 1994. *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*. Prague and Dordrecht, Boston, London: Academia and Kluwer Academic Publishers.

Moravec, F. 2007. Some aspects of the taxonomy and biology of adult spirurine nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica*, 54:239–257. https://doi.org/10.14411/fp.2007.033

Moravec, F., Boomker, J. & Taraschewski, H. 2000. *Paraquimperia africana* n. sp. (Nematoda: Quimperiidae), a new intestinal parasite of the eel *Anguilla mossambica* Peters, in South Africa. *The Journal of Parasitology*, 86:113–117. https://doi.org/10.2307/3284919

Moravec, F. & Cosgrove, G. E. 1982. *Pseudocapillaroides xenopi* gen. *et* sp. nov. from the skin of the South African Clawed Frog *Xenopus laevis* Daud. (Nematoda: Capillariidae). *Revue de Zoologie Africaine*, 96:129–137

Moravec, F., Jansen van Rensburg, C. & van As, L. L. 2016. Larvae of *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in the threatened freshwater fish *Sandelia capensis* (Anabantidae) in South Africa. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120:251–254. https://doi.org/10.3354/dao03033

Moravec, F. & Justine, J.-L. 2006. *Camallanus cotti* (Nematoda: Camallanidae), an introduced parasite of fishes in New Caledonia. *Folia Parasitologica*, 53:287–296. https://doi.org/10.14411/fp.2006.035

Moravec, F., Justine, J.-L., Würzt, J., Taraschewski, H. & Sasal, P. 2006. A new species of *Procamallanus* (Nematoda: Camallanidae) from Pacific eels (*Anguilla* spp.). *The Journal of Parasitology*, 92:130–137. https://doi.org/10.1645/ge-3509.1

Moravec, F., Nie, P. & Guitang, W. 2004. Redescription of *Camallanus hypophthalmichthys* Dogel and Akhmerov, 1959 (Nematoda: Camallanidae) and its first record from fishes in China. *Journal of Parasitology*, 90:1463–1467. https://doi.org/10.1645/ge-3391

Moravec, F., Prokopic, J. & Schlikas, A. V. 1987. The biology of the nematodes of the family Capillariidae, Neveu-Lemaire, 1936. *Folia Parasitologica*, 34:39–56

Moravec, F. & Scholtz, T. 2017. Some nematodes, including two new species, from freshwater fishes in the Sudan and Ethiopia. *Folia Parasitologica*, 64, art. 010. https://doi.org/10.14411/fp.2017.010

Moravec, F. & van As, L. L. 2015. Studies on ascaridid, oxyurid and enoplid nematodes (Nematoda) from fishes of the Okavango River, Botswana. *Folia Parasitologica*, 62, art. 039. https://doi.org/10.14411/fp.2015.039

Morens, D. M., Daszak, P., Markel, H. & Taubenberger, J. K. 2020. Pandemic COVID-19 joins history's pandemic legion. *mBio*, 11, e00812–20. https://doi.org/10.1128/mbio.00812-20

Moyo, D. Z., Chimbira, C. & Yalala, P. 2009. Observations on the helminth parasites of fish in Insukamini dam, Zimbabwe. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5:782–785

Mueller, J. F. 1934. Parasites of Oneida Lake fishes. Part 4. Additional notes on parasites of Oneida Lake fishes, including descriptions of new species. *Roosevelt Wildlife Annals*, 3:335–373

Nadler, S. A., D'Amelio, S., Fagerholm, H. P., Berland, B. & Paggi, L. 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Høst, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, 121:455–463. https://doi.org/10.1017/s0031182099006423

Naidu, T. S. V. 1983. Records of some nematode parasites of fishes of Vidarbha region, Maharashtra State, India. *Rivista di Parassitologia*, 44:143–146

Nakagawa, S. & Schielzeth, H. 2013. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, 4:133–142. https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x

Nakao, M., Sako, Y. & Ito, A. 2003. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: a finding of the abbreviated stop codon U. *Journal of Parasitology*, 89:633–635. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0633:tmgott]2.0.co;2

Nam, U.-H., Whang, I. & Kim, J.-H. 2020. The complete mitochondrial genome sequence of *Microcotyle caudata* (Platyhelminthes: Monogenea) from dark-banded rockfish (*Sebastes inermis*) in Korea. *Mitochondrial DNA Part B*, 5:1817–1819. https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1750986

National Center for Biotechnology Information 2021. Organelle Genome Resources. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/organelles/. Date of access: 19 March 2021.

Neal, R. M. 2011. MCMC Using Hamiltonian Dynamics. Vol. 2, *Handbook of Markov Chain Monte Carlo*. New York: CRC Press.

Nelson, F. B., Brown, G. P., Shilton, C. M. & Shine, R. 2015. Helpful invaders: can cane toads reduce the parasite burdens of native frogs? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4:295–300. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.05.004

Nie, P. & Kennedy, C. R. 1991. Seasonal population dynamics of *Paraquimperia tenerrima* (Linstow) (Nematoda) in the European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus) in three localities

of southwest England. *Journal of Fish Biology*, 39:441–449. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04375.x

Nieberding, C. M. & Olivieri, I. 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? *Trends in Ecology and Evolution*, 22:156–165. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.012

Nigrelli, R. F. & Maraventano, L. W. 1944. Pericarditis in *Xenopus laevis* caused by *Diplostomulum xenopi* sp. nov., a larval strigeid. *The Journal of Parasitology*, 30:184–190. https://doi.org/10.2307/3272796

Ojala, D., Montoya, J. & Attardi, G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290:470–474. https://doi.org/10.1038/290470a0

Okada, K., Yamazaki, Y., Yokobori, S. & Wada, H. 2010. Repetitive sequences in the lamprey mitochondrial DNA control region and speciation of *Lethenteron*. *Gene*, 465:45–52. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.009

Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... Wagner, H. 2019. vegan: community ecology package. R package version 2.5-6. https://CRAN.R-project.org/package=vegan

Ondračková, M., Matějusová, I. & Grabowska, J. 2012. Introduction of *Gyrodactylus percotti* (Monogenea) into Europe on its invasive fish host, Amur sleeper (*Perccottus glenii*, Dybowski 1877). *Helminthologia*, 49:21–26. https://doi.org/10.2478/s11687-012-0004-3

Ortega, N., Price, W., Campbell, T. & Rohr, J. 2015. Acquired and introduced macroparasites of the invasive Cuban treefrog, *Osteopilus septentrionalis*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4:379–384. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.10.002

Paradis, E. & Schliep, K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35:526–528. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633

Park, J.-K., Kim, K.-H., Kang, S., Kim, W., Eom, K. S. & Littlewood, D. T. J. 2007. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology*, 7, art. 11. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-11

Peig, J. & Green, A. J. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118:1883–1891. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x

Peig, J. & Green, A. J. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24:1323–1332. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x

Perkins, E. M., Donnellan, S. C., Bertozzi, T. & Whittington, I. D. 2010. Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 40:1237–1245. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.017

Perkins, S. E., White, T. A., Pascoe, E. L. & Gillingham, E. L. 2017. Parasite community dynamics in an invasive vole: from focal introduction to wave front. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6:412–419. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.07.005

Perna, N. T. & Kocher, T. D. 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate site of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41:353–358. https://doi.org/10.1007/bf00186547

Phillips, B. L., Kelehear, C., Pizzatto, L., Brown, G. P., Barton, D. & Shine, R. 2010. Parasites and pathogens lag behind their host during periods of host range advance. *Ecology*, 91:872–881. https://doi.org/10.1890/09-0530.1

Plaisance, L., Huyse, T., Littlewood, D. T. J., Bakke, T. A. & Bachmann, L. 2007. The complete mitochondrial DNA sequence of the monogenean *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes: Monogenea), a parasite of grayling (*Thymallus thymallus*). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 154:190–194. https://doi.org/0.1016/j.molbiopara.2007.04.012

Pochini, K. M. & Hoverman, J. T. 2017. Immediate and lag effects of pesticide exposure on parasite resistance in larval amphibians. *Parasitology*, 144:817–822. https://doi.org/10.1017/s0031182016002560

Poisot, T. & Stouffer, D. 2015. When is cophylogeny evidence of coevolution? In: Morand, B. R., Krasnov, S. & Littlewood, D. T., eds. *Parasite Diversity and Diversification*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 420–434.

Polson, N. G. & Scott, J. G. 2012. On the half-Cauchy prior for a global scale parameter. *Bayesian Analysis*, 7:887–902. https://doi.org/10.1214/12-BA730

Porter, A. 1938. The larval trematodes found in certain South African Mollusca with special reference to schistosomiasis (bilharziasis). *Publications of the South African Institution of Medical Research*, 42:682–683. https://doi.org/10.1001/jama.1940.02810080054030

Posada, D. 2003. Using MODELTEST and PAUP$*$ to select a model of nucleotide substitution. *Current Protocols in Bioinformatics*, 00:6.5.1–6.5.14. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0605s00

Poulin, R. 2007. The structure of parasite communities in fish hosts: ecology meets geography and climate. *Parassitologia*, 49:169–172

Poulin, R. 2019. Best practice guidelines for studies of parasite community ecology. *Journal of Helminthology*, 93:8–11. https://doi.org/10.1017/s0022149x18000767

Poulin, R. & Morand, S. 2004. *Parasite Biodiversity*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Books.

Prentis, P. J., Sigg, D. P., Raghu, S., Dhileepan, K., Pavasovic, A. & Lowe, A. J. 2009. Understanding invasion history: genetic structure and diversity of two globally invasive plants and implications for their management. *Diversity and Distributions*, 15:822–830. https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2009.00592.x

Price, E. W. 1943. A new trematode of the genus *Polystoma* (Monogenea: Polystomatidae) from *Xenopus laevis* Daud. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 10:83–85

Prior, K. M. & Hellmann, J. J. 2015. Does enemy release contribute to the success of invasive species? A review of the enemy release hypothesis. In: Keller, R., Cadotte, M. & Sandiford, G., eds. *Invasive Species in a Globalized World*. Chicago: University of Chicago Press.

Prior, K. M., Powell, T. H. Q., Joseph, A. L. & Hellmann, J. J. 2015. Insight from community ecology into the role of enemy release in causing invasion success: the importance of native enemy effects. *Biological Invasions*, 17:1283–1297. https://doi.org/10.1007/s10530-014-0800-4

Pritchard, M. H. 1964. Notes on four helminths from the Clawed Toad, *Xenopus laevis* (Daudin), in South Africa. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 31:121–128

Prudhoe, S. & Bray, R. A. 1982. *Platyhelminth parasites of the Amphibia*. Oxford: Oxford University Press.

Puigbò, P., Bravo, I. G. & Garcia-Vallve, S. 2008. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, 3, art. 38. https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38

QGIS Development Team. 2018. *QGIS Geographic Information System*. Oregon, United States of America: Open Source Geospatial Foundation Project. http://qgis.osgeo.org/

R Core Team. 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

R Core Team. 2020. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Raharivololoniaina, L., Verneau, O., Berthier, P., Vences, M. & du Preez, L. H. 2011. First monogenean flatworm from a microhylid frog host: *Kankana*, a new polystome genus from Madagascar. *Parasitology International*, 60:465–473. https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.08.001

Rambaut, A. 2018. FigTree *version* 1.4.4 http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

Řehulková, E., Baruš, V. & Gelnar, M. 2005. Two remarkable nematodes from the African reedfish *Erpetoichthys calabaricus* (Polypteriformes: Polypteridae). *Helminthologia*, 42:149–153

Revell, L. J. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3:217–223. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x

Ricciardi, A. 2007. Are modern biological invasions an unprecedented form of global change? *Conservation Biology*, 21:329–336. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00615.x

Richardson, D. M., Carruthers, J., Hui, C., Impson, F. A. C., Miller, J. T., Robertson, M. P., ... Wilson, J. R. U. 2011a. Human-mediated introductions of Australian acacias: a global experiment in biogeography. *Diversity and Distributions*, 17:771–787. https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00824.x

Richardson, D. M., Pyšek, P. & Carlton, J. T. 2011b. A compendium of essential concepts and terminology in invasion ecology. In: Richardson, D. M., ed. *Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton*. Oxford: Wiley-Blackwell.

Richardson, D. M. & Ricciardi, A. 2013. Misleading criticisms of invasion science: a field guide. *Diversity and Distributions*, 19:1461–1467. https://doi.org/10.1111/ddi.12150

Ricklefs, R. E. 2010. Host-pathogen coevolution, secondary sympatry and species diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 365:1139–1147. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0279

Ricotta, C. & Podani, J. 2017. On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecological Complexity*, 31:201–205. https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003

Rödder, D., Ihlow, F., Courant, J., Secondi, J., Herrel, A., Rebelo, R., ... Backeljau, T. 2017. Global realized niche divergence in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Ecology and Evolution*, 7:4044–4058. https://doi.org/10.1002/ece3.3010

Rodrigues, R. A. E. 2014. *Macroparasites of invasive Xenopus laevis (Amphibia: Anura): characterization and assessment of possible exchanges with native Pelophylax perezi in Oeiras streams, Portugal*. Lisbon: University of Lisboa. (Dissertation – MSc).

Rohr, J. R., Raffel, T. R., Sessions, S. K. & Hudson, P. J. 2008. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecological Applications*, 18:1743–1753. https://doi.org/10.1890/07-1429.1

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Hohna, S., ... Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61:539–542. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029

Ross, E., Blair, D., Guerrero-Hernández, C. & Alvarado, A. S. 2016. Comparative and transcriptome analyses uncover key aspects of coding and long noncoding RNAs in flatworm mitochondrial genomes. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 6:1191–1200. https://doi.org/10.1534/g3.116.028175

Roy, H. E. & Lawson Handley, L.-J. 2012. Networking: a community approach to invaders and their parasites. *Functional Ecology*, 26:1238–1248. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02032.x

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. & Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34:3299–3302. https://doi.org/10.1093/molbev/msx248

Roznik, E. A., Surbaugh, K. L., Cano, N. & Rohr, J. R. 2020. Elucidating mechanisms of invasion success: effects of parasite removal on growth and survival rates of invasive and native frogs. *Journal of Applied Ecology*, 57:1078–1088. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13634

Rumschlag, S. L., Halstead, N. T., Hoverman, J. T., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Hudson, P. J. & Rohr, J. R. 2019. Effects of pesticides on exposure and susceptibility to parasites can be generalised to pesticide class and type in aquatic communities. *Ecology Letters*, 22:962–972. https://doi.org/10.1111/ele.13253

Sandon, H. 1941. Studies on South African endozoic ciliates I. *Paranyctotherus* (*Balantidium*) *kirbyi* (Rodriquez) emend., gen. nov. from the rectum of the clawed toad, *Xenopus laevis*. *South African Journal of Medical Science*, 6:116–127

Sara, J. R., Smit, W. J., Erasmus, L. J. C., Ramalepe, T. P., Mogashoa, M. E., Raphahlelo, M. E., ... Luus-Powell, W. J. 2014. Ecological status of Hout River Dam, Limpopo province, South Africa, using fish condition and health assessment index protocols: a preliminary investigation. *African Journal of Aquatic Science*, 39:35–43. https://doi.org/10.2989/16085914.2013.848181

Saraiva, A. & Chubb, J. C. 1989. Preliminary observations on the parasites of *Anguilla anguilla* (L.) from Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Parasitologists*, 9:88–89

Sasal, P., Taraschewski, H., Valade, P., Grondin, H., Wielgoss, S. & Moravec, F. 2008. Parasite communities in eels of the Island of Reunion (Indian Ocean): a lesson in

parasite introduction. *Parasitology Research*, 102:1343–1350. https://doi.org/10.1007/s00436-008-0916-5

Schielzeth, H. 2010. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients. *Methods in Ecology and Evolution*, 1:103–113. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x

Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier, R. H. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55:421–438. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085432

Schlötterer, C., Tobler, R., Kofler, R. & Nolte, V. 2014. Sequencing pools of individuals — mining genome-wide polymorphism data without big funding. *Nature Reviews Genetics*, 15:749–763. https://doi.org/10.1038/nrg3803

Schoeman, A. L., Joubert, T.-L., du Preez, L. H. & Svitin, R. 2020. *Xenopus laevis* as UberXL for nematodes. *African Zoology*, 55:7–24. https://doi.org/10.1080/15627020.2019.1681295

Schoeman, A. L., Kruger, N., Secondi, J. & du Preez, L. H. 2019. Repeated reduction in parasite diversity in invasive populations of *Xenopus laevis*: a global experiment in enemy release. *Biological Invasions*, 21:1323–1338. https://doi.org/10.1007/s10530-018-1902-1

Schultheis, E. H., Berardi, A. E. & Lau, J. A. 2015. No release for the wicked: enemy release is dynamic and not associated with invasiveness. *Ecology*, 96:2446–2457. https://doi.org/10.1890/14-2158.1

Selechnik, D., Rollins, L. A., Brown, G. P., Kelehear, C. & Shine, R. 2017. The things they carried: the pathogenic effects of old and new parasites following intercontinental invasion of the Australian cane toad (*Rhinella marina*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6:375–385. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.12.001

Senapin, S., Phiwsaiya, K., Laosinchai, P., Kowasupat, C., Ruenwongsa, P. & Panijpan, B. 2014. Phylogenetic analysis of parasitic trematodes of the genus *Euclinostomum* found in *Trichopsis* and *Betta* fish. *The Journal of Parasitology*, 100:368–371. https://doi.org/10.1645/13-285.1

Shamsi, S., Norman, R., Gasser, R. B. & Beveridge, I. 2009. Redescription and genetic characterization of selected *Contracaecum* spp.(Nematoda: Anisakidae) from various hosts in Australia. *Parasitology Research*, 104:1507–1525. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1357-5

Shapiro, H. A. & Zwarenstein, H. 1934. A rapid test for pregnancy of *Xenopus laevis*. *Nature*, 133:762. https://doi.org/10.1038/133762a0

Sharp, P. M., Tuohy, T. M. & Mosurski, K. R. 1986. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 14:5125–5143. https://doi.org/10.1093/nar/14.13.5125

Shui, B. N., Han, Z. Q., Gao, T. X. & Miao, Z. Q. 2008. Tandemly repeated sequence in 5' end of mtDNA control region of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *African Journal of Biotechnology*, 7:4415–4422

Sievers, F. & Higgins, D. G. 2017. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Tools for Protein Science*, 27:135–145. https://doi.org/10.1002/pro.3290

Simberloff, D. 2011. How common are invasion-induced ecosystem impacts? *Biological Invasions*, 13:1255–1268. https://doi.org/10.1007/s10530-011-9956-3

Simpson, D., Rue, H., Riebler, A., Martins, T. G. & Sørbye, S. H. 2017. Penalising model component complexity: a principled, practical approach to constructing priors. *Statistical Science*, 32:1–28. https://doi.org/10.1214/16-sts576

Skrjabin, K. I., Shikhobalovna, P. & Lagodovskaey, A. A. 1964. Oxyurata of animals and man. In: Skrjabin, K. I., ed. *Essentials of Nematology, Part 3, Volume 13*. Moscow: Academy of Sciences of the USSR.

Smit, W. J. & Luus-Powell, W. J. 2012. The occurrence of metazoan endoparasites of *Schilbe intermedius* Rüppell, 1832 from the Nwanedi-Luphephe Dams in the Limpopo River System, South Africa. *African Zoology*, 47:35–41. https://doi.org/10.1080/15627020.2012.11407520

Smith, D. R. 2015. The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced enough mtDNAs? *Briefings in Functional Genomics*, 15, 47–54. https://doi.org/10.1093/bfgp/elv027

Smyth, G. K. 1996. Regression analysis of quantity data with exact zeros. *Conference proceedings*. Second Australia-Japan Workshop on Stochastic Models in Engineering, Technology and Management. Brisbane: Technology Management Centre, University of Queensland. pp. 572–580.

Snyder, S. D. & Clopton, R. E. 2005. New methods for the collection and preservation of spirorchiid trematodes and polystomatid monogeneans from turtles. *Comparative Parasitology*, 72:102–107. https://doi.org/10.1654/4155

Solá, E., Álvarez Presas, M., Frías-López, C., Littlewood, D. T. J., Rozas, J. & Riutort, M. 2015. Evolutionary analysis of mitogenomes from parasitic and free-living flatworms. *PLOS One*, 10, art. 30120081. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120081

Solarz, W. & Najberek, K. 2017. Alien parasites may survive even if their original hosts do not. *EcoHealth*, 14, art. 3. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1092-6

Soubrier, J., Steel, M., Lee, M. S., Der Sarkissian, C., Guindon, S., Ho, S. Y. & Cooper, A. 2012. The influence of rate heterogeneity among sites on the time dependence of molecular rates. *Molecular Biology and Evolution*, 29:3345–3358. https://doi.org/10.1093/molbev/mss140

Southwell, T. & Kirshner, A. 1937. On some parasitic worms found in *Xenopus laevis*, the South African Clawed Toad. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 31:245–265. https://doi.org/10.1080/00034983.1937.11684979

Souty-Grosset, C., Anastácio, P. M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C. & Tricarico, E. 2016. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: impacts on aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologica*, 58:78–93. https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003

Šrámek, A. 1901. Helminthen der an der zoologische Station in Podiebrad (Böhmen) untersuchten Fische. *Archiv für naturwissenschaftliche Landesfurchforschung Böhmens*, 11:94–118

Stekhoven, D. J. 2013. missForest: nonparametric missing value imputation using random forest. R package *version* 1.4

Stekhoven, D. J. & Bühlmann, P. 2012. MissForest: non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, 28:112–118. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597

Stephens, L. C., Cromeens, D. M., Robbins, V. W., Stromberg, P. C. & Jardine, J. H. 1987. Epidermal capillariasis in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Laboratory Animal Science*, 37:341–344

Stouthamer, R., Rugman-Jones, P., Thu, P. Q., Eskalen, A., Thibault, T., Hulcr, J., ... Zong, S. 2017. Tracing the origin of a cryptic invader: phylogeography of the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) species complex. *Agricultural and Forest Entomology*, 19:366–375. https://doi.org/10.1111/afe.12215

Stöver, B. C. & Müller, K. F. 2010. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, 11, art. 7. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7

Stromberg, P. C. & Crites, J. L. 1974. Specialization, body volume, and geographical distribution of Camallanidae (Nematoda). *Systematic Zoology*, 23:189–201. https://doi.org/10.2307/2412131

Stuart, P., Paredis, L., Henttonen, H., Lawton, C., Ochoa Torre, C. A. & Holland, C. V. 2020. The hidden faces of a biological invasion: parasite dynamics of invaders and natives. *International Journal for Parasitology*, 50:111–123. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.11.003

Sures, B., Nachev, M., Pahl, M., Grabner, D. & Selbach, C. 2017. Parasites as drivers of key processes in aquatic ecosystems: facts and future directions. *Experimental Parasitology*, 180:141–147. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.011

Svitin, R., Schoeman, A. L. & du Preez, L. H. 2018. New information on morphology and molecular data of camallanid nematodes parasitising *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae) in South Africa. *Folia Parasitologica*, 65, art. 003. https://doi.org/10.14411/fp.2018.003

Tabei, Y., Kiryu, H., Kin, T. & Asai, K. 2008. A fast structural multiple alignment method for long RNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 9, art. 33. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-33

Taskinen, S. & Warton, D. I. 2011. Robust estimation and inference for bivariate line-fitting in allometry. *Biometrical Journal*, 53:652–672. https://doi.org/10.1002/bimj.201000018

Tavakol, S., Smit, W. J., Sara, J. R., Halajian, A. & Luus-Powell, W. J. 2015. Distribution of *Contracaecum* (Nematoda: Anasakidae) larvae in freshwater fish from the northern regions of South Africa. *African Zoology*, 50:133–139. https://doi.org/10.1080/15627020.2015.1052302

Tavaré, S. 1986. Some probabalistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17:56–86

Telfer, S. & Bown, K. 2012. The effects of invasion on parasite dynamics and communities. *Functional Ecology*, 26:1288–1299. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02049.x

Theunissen, M., Tiedt, L. & du Preez, L. H. 2014. The morphology and attachment of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) infecting the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Parasite*, 21, art. 20. https://doi.org/10.1051/parasite/2014020

Thielin, F., Münderle, M., Taraschewski, H. & Sures, B. 2007. Do eel parasites reflect the local crustacean community? A case study from the Rhine river system. *Journal of Helminthology*, 81:179–189. https://doi.org/10.1017/S0022149X07753725

Thompson, C. W., Phelps, K. L., Allard, M. W., Cook, J. A., Dunnum, J. L., Ferguson, A. W., ... Kilpatrick, C. W. 2021. Preserve a voucher specimen! The critical need for integrating natural history collections in infectious disease studies. *mBio*, 12, e02698–20. https://doi.org/10.1128/mbio.02698-20

Thorpe, R. S. 1981. A comparative study of ordination techniques in numerical taxonomy in relation to racial variation in the ringed snake *Natrix natrix* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society*, 13:7–40. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1980.tb00067.x

Thurston, J. P. 1967. The morphology and life-cycle of *Cephalochlamys namaquensis* (Cohn, 1906) (Cestoda: Pseudophyllidea) from *Xenopus muelleri* and *X. laevis*. *Parasitology*, 57:187–200. https://doi.org/10.1017/S0031182000072000

Thurston, J. P. 1970. Studies on some Protozoa and helminth parasites of *Xenopus*, the African Clawed Toad. *Revue de Zoologie et de Botanique Africaines*, 82:349–368

Tinsley, R. C. 1972. The adaptation of attachment by the Polystomatidae (Monogenoidea). *Conference proceedings*. Comptes-Rendus Multicolloque Europeen de Parasitologie. pp. 65–68.

Tinsley, R. C. 1996. Parasites of *Xenopus*. In: Tinsley, R. C. & Kobel, H. R., eds. Vol. 1, *The Biology of Xenopus*. Oxford: Clarendon Press. pp. 233–261.

Tinsley, R. C. & Jackson, J. A. 1995. The genus *Oligolecithus* Vercammen-Grandjean (Digenea: Telorchiidae) from *Xenopus* spp. (Anura: Pipidae), with a description of *O. siluranae* n. sp. from *X. tropicalis* (Gray) in Ghana. *Systematic Parasitology*, 32:131–140. https://doi.org/10.1007/BF00009512

Tinsley, R. C. & Jackson, J. A. 1998a. Correlation of parasite speciation and specificity with host evolutionary relationships. *International Journal for Parasitology*, 28:1573–1582. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00085-x

Tinsley, R. C. & Jackson, J. A. 1998b. Speciation of *Protopolystoma* Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) in hosts of the genus *Xenopus* (Anura: Pipidae). *Systematic Parasitology*, 40:93–141. https://doi.org/10.1023/B:SYPA.0000004047.41228.a6

Tinsley, R. C., Kobel, H. R. & Fischberg, M. 1979. The biology and systematics of a new species of *Xenopus* (Anura: Pipidae) from the highlands of Central Africa. *Journal of Zoology*, 188:69–102

Tinsley, R. C., Stott, L. C., Viney, M. E., Mable, B. K. & Tinsley, M. C. 2015. Extinction of an introduced warm-climate alien species, *Xenopus laevis*, by extreme weather events. *Biological Invasions*, 17:3183–3195. https://doi.org/10.1007/s10530-015-0944-x

Tinsley, R. C. & Sweeting, R. A. 1974. Studies on the biology and taxonomy of *Diplostomulum* (*Tylodelphylus*) *xenopodis* from the African Clawed Toad, *Xenopus laevis*. *Journal of Helminthology*, 48:247–263. https://doi.org/10.1017/S0022149X00022938

Tinsley, R. C. & Whitear, M. 1980. The surface fauna of *Xenopus* skin. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 79:127–129. https://doi.org/10.1017/S026972700001037X

Tinsley, R. C. & Wynne Owen, R. 1975. Studies on the biology of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenoidea): the oncomiracidium and life-cycle. *Parasitology*, 71:445–463. https://doi.org/10.1017/s0031182000047211

Tinsley, R. C. & Wynne Owen, R. 1979. The morphology and biology of *Xenopodistomum xenopodis* from the gall bladder of the African Clawed Toad, *Xenopus laevis*. *Journal of Helmintology*, 53:307–316. https://doi.org/10.1017/S0022149X00006155

Tkach, V. V., Kuzmin, Y. & Snyder, S. D. 2014. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. *International Journal for Parasitology*, 44:273–298. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.12.005

Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J. & Kuris, A. M. 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature*, 421:628–630. https://doi.org/10.1038/nature01346

Torchin, M. E., Lafferty, K. D. & Kuris, A. M. 2001. Release from parasites as natural enemies: increased performance of a globally introduced marine crab. *Biological Invasions*, 3:333–345. https://doi.org/10.1023/A:1015855019360

Torchin, M. E. & Mitchell, C. E. 2004. Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2:183–190. https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0183:PPAIBP]2.0.CO;2

Valenzuela-Sánchez, A., Wilber, M. Q., Canessa, S., Bacigalupe, L. D., Muths, E., Schmidt, B. R., ... Cayuela, H. 2021. Why disease ecology needs life-history theory: a host perspective. *Ecology Letters*, 24:876–890. https://doi.org/10.1111/ele.13681

van As, J. G. & Basson, L. 1984. Checklist of freshwater fish parasites from southern Africa. *South African Journal of Wildlife Research*, 14:49–61

van der Lande, V. M. & Tinsley, R. C. 1976. Studies on the anatomy, life history and behaviour of *Marsupiobdella africana* (Hirudinea: Glossiphoniidae). *Journal of Zoology*, 180:537–563. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1976.tb04703.x

van Etten, J. 2017. R package gdistance: distances and routes on geographical grids. *Journal of Statistical Software*, 76:1–21. https://doi.org/10.18637/jss.v076.i13

van Sittert, L. & Measey, G. J. 2016. Historical perspectives on global exports and research of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 71:157–166. https://doi.org/10.1080/0035919x.2016.1158747

van Wilgen, B. W., Measey, J., Richardson, D. M., Wilson, J. R. & Zengeya, T. A. 2020. Biological invasions in South Africa: an overview. In: van Wilgen, B., Measey, J., Richardson, D., Wilson, J. & Zengeya, T., eds. *Biological Invasions in South Africa*. Springer International Publishing. pp. 3–31.

Vanhove, M., Tessens, B., Schoelinck, C., Jondelius, U., Littlewood, T., Artois, T. & Huyse, T. 2013. Problematic barcoding in flatworms: a case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *ZooKeys*, 365:355–379. https://doi.org/10.3897/zookeys.365.5776

Vanhove, M. P. M., Briscoe, A. G., Jorissen, M. W. P., Littlewood, D. T. J. & Huyse, T. 2018. The first next-generation sequencing approach to the mitochondrial phylogeny of African

monogenean parasites (Platyhelminthes: Gyrodactylidae and Dactylogyridae). *BMC Genomics*, 19, art. 520. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4893-5

Vercammen-Grandjean, P. H. 1960. Les trématodes du Lac Kivu Sud (Vermes). *Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale*, 5:1–176

Verneau, O., du Preez, L. H., Laurent, V., Raharivololoniaina, L., Glaw, F. & Vences, M. 2009. The double odyssey of Madagascan polystome flatworms leads to new insights on the origins of their amphibian hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276:1575–1583. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1530

Verneau, O., Palacios, C., Platt, T., Alday, M., Billard, E., Allienne, J.-F., ... du Preez, L. H. 2011. Invasive species threat: parasite phylogenetics reveals patterns and processes of host-switching between non-native and native captive freshwater turtles. *Parasitology*, 138:1778–1792. https://doi.org/10.1017/s0031182011000333

Vimercati, G., Kruger, N. & Secondi, J. 2021. Land cover, individual's age and spatial sorting shape landscape resistance in the invasive frog *Xenopus laevis*.

Vimercati, G., Labadesse, M., Dejean, T. & Secondi, J. 2020. Assessing the effect of landscape features on pond colonisation by an elusive amphibian invader using environmental DNA. *Freshwater Biology*, 65:502–513. https://doi.org/10.1111/fwb.13446

von Linstow, O. F. B. 1879. Helminthologische Untersuchungen. *Jahresbericht des Vereins für vaterländische Naturkunde in Würtemberg*, 35:313–342

von Nickisch-Rosenegk, M., Brown, W. M. & Boore, J. L. 2001. Complete sequence of the mitochondrial genome of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*: gene arrangements indicate that platyhelminths are eutrochozoans. *Molecular Biology and Evolution*, 18:721–730. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003854

Wade, S. E. 1981. *The parasites of Xenopus laevis Daudin (South African Clawed Frog) with special reference to the bionomics and pathogenicity of Capillaria xenopodis sp. n. (Trichoidea: Trichuridae)*. Ithaca, NY: College of Veterinary Science, Cornell University. (Thesis – PhD).

Wade, S. E. 1982. *Capillaria xenopodis* sp. n. (Nematoda: Trichuroidea) from the epidermis of the South African Clawed Frog (*Xenopus laevis* Daudin). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 49:86–92

Waeschenbach, A., Brabec, J., Scholtz, T., Littlewood, D. T. J. & Kuchta, R. 2017. The catholic taste of broad tapeworms – multiple routes to human infection. *International Journal for Parasitology*, 47:831–843. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.004

Wang, S., Hong, Y. & Measey, G. J. 2019. An established population of African clawed frogs, *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), in mainland China. *BioInvasions Records*, 8:457–464. https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.2.29

Warburton, E. M., Kohler, S. L. & Vonhof, M. J. 2016. Patterns of parasite community dissimilarity: the significant role of land use and lack of distance-decay in a bat-helminth system. *Oikos*, 125:374–385. https://doi.org/10.1111/oik.02313

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 360:1847–1857. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716

Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S. & Taskinen, S. 2012. smatr 3: an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, 3:257–259. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00153.x

Warton, D. I. & Weber, N. C. 2002. Common slope tests for errors-in-variables models. *Biometrical Journal*, 44:161–174. https://doi.org/10.1002/1521-4036(200203)44:2⟨161::AID-BIMJ161⟩3.0.CO;2-N

Weldon, C., de Villiers, A. L. & du Preez, L. H. 2007. Quantification of the trade in *Xenopus laevis* from South Africa, with implications for biodiversity conservation. *African Journal of Herpetology*, 56:77–83. https://doi.org/10.1080/21564574.2007.9635553

Wey-Fabrizius, A. R., Podsiadlowski, L., Herlyn, H. & Hankeln, T. 2013. Platyzoan mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69:365–375. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.12.015

Whitfield, A. K. & Heeg, J. 1977. On the life cycles of the cestode *Ptychobothrium belones* and nematodes of the genus *Contracaecum* from Lake St Lucia, Zululand. *South African Journal of Science*, 73:121–122

Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag.

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., D'Agostino McGowan, L., François, R., ... Yutani, H. 2019. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4, art. 1686. https://doi.org/10.21105/joss.01686

Wickham, H., Francois, R., Henry, L. & Müller, K. 2017. dplyr: a grammar of data manipulation. R package version 0.7.4 https://CRAN.R-project.org/package=dplyr

Williams, J. B. 1959. Preliminary notes on the anatomy of a polystome from the bladder of *Xenopus laevis* Daud. *Journal of Helmintology*, 33:207–208. https://doi.org/10.1017/S0022149X00033459

Yamaguti, S. 1961. *The Nematodes of Vertebrates. Parts 1 & 2*, Vol. Systema Helminthum III. New York: Interscience Publishers.

Yang, Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39:306–314. https://doi.org/10.1007/BF00160154

Ye, F., King, S. D., Cone, D. K. & You, P. 2014. The mitochondrial genome of *Paragyrodactylus variegatus* (Platyhelminthes: Monogenea): differences in major non-coding region and gene order compared to *Gyrodactylus*. *Parasites & Vectors*, 7, art. 377. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-377

Yeh, L. S. 1960a. On a reconstruction of the genus *Camallanus* Railliet and Henry, 1915. *Journal of Helminthology*, 34:117–124. https://doi.org/10.1017/s0022149x00020435

Yeh, L. S. 1960b. On *Camallanus johni* sp. nov., collected from *Xenopus* in Tanganyika territory. *Journal of Helminthology*, 34:103–106. https://doi.org/10.1017/S0022149X00020411

Yorke, W. & Maplestone, P. A. 1926. *The Nematode Parasites of Vertebrates*. Philadelphia, Pennsylvania: P. Blakiston's Son & Co.

Zahiri, R., Christian Schmidt, B., Schintlmeister, A., Yakovlev, R. V. & Rindoš, M. 2019. Global phylogeography reveals the origin and the evolutionary history of the gypsy moth (Lepidoptera, Erebidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 137:1–13. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.021

Zhang, D., Li, W. X., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., ... Wang, G. 2019a. Homoplasy or plesiomorphy? Reconstruction of the evolutionary history of mitochondrial gene order rearrangements in the subphylum Neodermata. *International Journal for Parasitology*, 49:819–829. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.05.010

Zhang, D., Li, W. X., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., ... Wang, G. T. 2018a. Mitochondrial genomes of two diplectanids (Platyhelminthes: Monogenea) expose paraphyly of the order Dactylogyridea and extensive tRNA gene rearrangements. *Parasites & Vectors*, 11, art. 601. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3144-6

Zhang, D., Li, W. X., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., ... Wang, G. T. 2020. Mitochondrial genomes and 28S rDNA contradict the proposed obsoletion of the order Tetraonchidea (Platyhelminthes: Monogenea). *International Journal of Biological Macromolecules*, 143:891–901. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.150

Zhang, D., Zou, H., Jakovlić, I., Wu, S. G., Li, M., Zhang, J., ... Wang, G. T. 2019b. Mitochondrial genomes of two *Thaparocleidus* species (Platyhelminthes: Monogenea) reveal the first rRNA gene rearrangement among the Neodermata. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, art. 4214. https://doi.org/10.3390/ijms20174214

Zhang, D., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., Zhang, J., ... Wang, G. T. 2018b. Three new Diplozoidae mitogenomes expose unusual compositional biases within the Monogenea class: implications for phylogenetic studies. *BMC Evolutionary Biology*, 18, art. 133. https://doi.org/10.1186/s12862-018-1249-3

Zhang, D., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., Zhang, J., ... Li, W. X. 2017. Sequencing of the complete mitochondrial genome of a fish-parasitic flatworm *Paratetraonchoides inermis* (Platyhelminthes: Monogenea): tRNA gene arrangement reshuffling and implications for phylogeny. *Parasites & Vectors*, 10, art. 462. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2404-1

Zhang, D., Zou, H., Wu, S. G., Li, M., Jakovlić, I., Zhang, J., ... Li, W. X. 2018c. Sequencing, characterization and phylogenomics of the complete mitochondrial genome of *Dactylogyrus lamellatus* (Monogenea: Dactylogyridae). *Journal of Helminthology*, 92:455–466. https://doi.org/10.1017/S0022149X17000578

Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25:99–120. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(96)00042-7

Zhang, D. X., Szymura, J. M. & Hewitt, G. M. 1995. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 40:382–391

Zhang, J., Wu, X., Li, Y., Xie, M. & Li, A. 2016. The complete mitochondrial genome of *Tetrancistrum nebulosi* (Monogenea: Ancyrocephalidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27:22–23. https://doi.org/10.3109/19401736.2013.867441

Zhang, J., Wu, X., Li, Y., Zhao, M., Xie, M. & Li, A. 2014. The complete mitochondrial genome of *Neobenedenia melleni* (Platyhelminthes: Monogenea): mitochondrial gene content, arrangement and composition compared with two *Benedenia* species. *Molecular Biology Reports*, 41:6583–6589. https://doi.org/10.1007/s11033-014-3542-6

Zhang, J., Wu, X., Xie, M. & Li, A. 2012. The complete mitochondrial genome of *Pseudochauhanea macrorchis* (Monogenea: Chauhaneidae) revealed a highly repetitive region and a gene rearrangement hot spot in Polyopisthocotylea. *Molecular Biology Reports*, 39:8115–8125. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1659-z

Zhang, J., Wu, X., Xie, M., Xu, X. & Li, A. 2011. The mitochondrial genome of *Polylabris halichoeres* (Monogenea: Microcotylidae). *Mitochondrial DNA*, 22:3–5. https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588223

Zhu, X., D'Amelio, S., Hu, M., Paggi, L. & Gasser, R. B. 2001. Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Electrophoresis*, 22:1930–1934. https://doi.org/10.1002/1522-2683(200106)22:10⟨1930::AID-ELPS1930⟩3.0.CO;2-Z

Zuur, A. F., Hilbe, J. M. & Ieno, E. N. 2015. *A Beginner's Guide to GLM and GLMM with R: A Frequentist and Bayesian Perspective for Ecologists*. Newburgh: Highland Statistics Limited.

Zuur, A. F. & Ieno, E. N. 2016. A protocol for conducting and presenting results of regression-type analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, 7:636–645. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12577

Zuur, A. F., Ieno, E. N. & Elphick, C. S. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1:3–14. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x

Bylaag A

Inligting oor waterliggame waar *Xenopus laevis* vir parasitologiese opnames versamel is

Tabel A.1: Breedvoerige inligting oor die vindoorde op vier kontinente waar *Xenopus laevis*-eksemplare vir parasitologiese opnames versamel is. Eksemplare vanuit 14 waterliggame wat opgeteken is in voorheen gepubliseerde werke van Chili (Castillo *et al.*, 2017), Portugal (Rodrigues, 2014) en Kalifornië, VSA (Kuperman *et al.*, 2004) is ingesluit, tesame met die 47 waterliggame van westelike Frankryk, Portugal en Suid-Afrika wat in die huidige studie nagegaan is. Liggings in Suid-Afrika is volgens die naaste dorp en provinsie benoem. Die bestudeerde waterliggame in Suid-Afrika is volgens habitattipe vir die analises in hoofstuk 5 geklassifiseer (Habitat). Waterliggame in Suid-Afrika, Frankryk en Protugal is verder volgens die filogeografiese stamlyn (SA1–7) van die versamelde *X. laevis*, na aanleiding van de Busschere *et al.* (2016), vir die analises in hoofstuk 6 geklassifiseer (Stamlyn). Daarbenewens word versamelmaand (Datum), breedte- en lengtegraad in desimale grade (Koördinate) en aantal *X. laevis* wat nagegaan is vir parasiete (Monstergrootte)vir elke waterliggaam gemeld, tesame met die hoofstuknommers wat die spesifieke ligging by analises betrek het (Hoofstuk(ke)).

Vindoord	Habitat	Stamlyn	Datum	Koördinate	Monstergrootte	Hoofstuk(ke)
Suidelike Afrika						
Adelaide, Oos-Kaap	Omstedelik	SA6	November 2017	32.6879°S; 26.2951°E	4	4,5,6
Barrydale 1, 2 & 4, Wes-Kaap	Natuurlik	SA3	November 2017	33.9264°S; 20.5917°E	2	4,5,6
	Onbegroeid & mensgemaak	SA3		33.9283°S; 20.5915°E	3	4,5,6
	Onbegroeid & mensgemaak			33.9313°S; 20.5873°E	4	4,5
Bloemfontein, Vrystaat	Omstedelik		November 2019	29.0636°S; 26.2188°E	6	4,5,7
Colesberg, Noord-Kaap	Onbegroeid & mensgemaak		Desember 2017	29.5848°S; 24.0146°E	7	4,5
Debshan-boerdery, Zimbabwe		SA5	November 2017	19.6825°S; 29.1547°E	1	4,6
Dullstroom, Mpumalanga	Natuurlik	SA5	April 2017	25.3981°S; 30.0380°E	10	2,3,4,5,6,B
Durbanville, Wes-Kaap	Begroeid & mensgemaak	SA1	Julie 2017	33.8392°S; 18.6003°E	5	2,3,4,5,6,B
George, Wes-Kaap	Omstedelik	SA2	Februarie 2018	33.9455°S; 22.4637°E	3	4,5,6
Hermanus, Wes-Kaap	Begroeid & mensgemaak	SA1	Junie 2017	34.3702°S; 19.2571°E	7	2,3,4,5,6,B
Hopetown, Noord-Kaap	Begroeid & mensgemaak	SA5	Desember 2017	33.3528°S; 20.4255°E	2	4,5,6
Johannesburg, Gauteng	Omstedelik	SA5	Februarie 2018	26.1251°S; 27.9222°E	6	4,5,6
Jonkershoek, Wes-Kaap		SA1	Februarie 2020	33.9584°S; 18.9169°E	1	6
Kaapstad, Weskaap	Omstedelik	SA1	Junie 2017	33.8355°S; 18.5528°E	14	2,3,4,5,6,B
Ladismith, Wes-Kaap	Natuurlik	SA3	November 2017	33.4637°S; 21.0970°E	6	4,5,6
Laingsburg, Wes-Kaap	Natuurlik	SA3	November 2017	33.3528°S; 20.4255°E	2	4,5,6

Tabel A.1: Breedvoerige inligting oor die vindoorde op vier kontinente waar *Xenopus laevis*-eksemplare vir parasitologiese opnames versamel is (*vervolg*).

Vindoord	Habitat	Stamlyn	Datum	Koördinate	Monstergrootte	Hoofstuk(ke)
Louis Trichardt, Limpopo	Begroeid & mensgemaak	SA5	Februarie 2019	23.0728°S; 30.0711°E	6	4,5,6
Matjiesfontein, Wes-Kaap		SA3	Februarie 2020	33.2294°S; 20.5816°E	3	6
Modimolle, Limpopo	Begroeid & mensgemaak	SA5	April 2017	24.6384°S; 28.4369°E	6	2,3,4,5,6,B
Polokwane, Limpopo	Onbegroeid & mensgemaak		April 2017	23.7693°S; 29.4047°E	7	2,4,5
Potchefstroom, Noordwes	Begroeid & mensgemaak	SA5	Maart 2017	26.7555°S; 27.0506°E	9	2,3,4,5,6,B
Richardsbaai, KwaZulu-Natal				28.7928°S; 26.0506°E	15	2
Riversdal, Wes-Kaap	Natuurlik	SA3	November 2017	33.7033°S; 21.1762°E	5	4,5,6
Drie Susters, Wes-Kaap	Begroeid & mensgemaak	SA4	November 2017	31.8950°S; 23.0957°E	5	4,5,6
	Natuurlik	SA4		31.8526°S; 23.2645°E	2	4,5,6
Tzaneen, Limpopo	Onbegroeid & mensgemaak	SA5	Mei 2017	23.7988°S; 30.1951°E	10	2,3,4,5,6,B
Ugie, Oos-Kaap	Begroeid & mensgemaak	SA6	Desember 2017	31.3049°S; 28.2646°E	6	4,5,6
Vanrhynsdorp, Wes-Kaap	Natuurlik	SA7	November 2017	31.7361°S; 18.8255°E	7	3,4,5,6
Verkykerskop, Vrystaat	Begroeid & mensgemaak	SA5	Januarie 2018	27.7833°S; 29.3363°E	7	4,5,6
Wakefield, KwaZulu-Natal	Natuurlik	SA5	Februarie 2018	29.4797°S; 29.8877°E	7	4,5,6
			April 2019	29.4825°S; 29.8889°E	1	5,6
Wellington 1 & 2, Wes-Kaap	Natuurlik		November 2017	33.5560°S; 18.8437°E	2	4,5
	Onbegroeid & mensgemaak	SA1		33.5714°S; 18.8401°E	6	3,4,5,6
Witrivier 1 & 2, Mpumalanga	Omstedelik	SA5	April 2017	25.3391°S; 31.0226°E	8	2,3,4,5,6,B
				25.3320°S; 31.0433°E	6	2,4,5,6
Chili						
Batuco-strandmeer, Batuco			1997–2014	33.2000°S; 70.8333°W	43	4
Carén-stroom, Alhue			1997–2014	34.0660°S; 71.2517°W	3	4

Tabel A.1: Breedvoerige inligting oor die vindoorde op vier kontinente waar *Xenopus laevis*-eksemplare vir parasitologiese opnames versamel is (*vervolg*).

Vindoord	Habitat	Stamlyn	Datum	Koördinate	Monstergrootte	Hoofstuk(ke)
Chilcas-stroom, Las Chilcas			1997–2014	32.8715 °S; 70.8453 °W	8	4
Córdova-stroom, El Tabo			1997–2014	33.4334 °S; 71.6457 °W	9	4
Ibacache-stroom, Ibacache			1997–2014	33.4514 °S; 71.3332 °W	24	4
La Patagua			1997–2014	34.7165 °S; 71.3850 °W	79	4
Les Molles-dam, El Yali National Park			1997–2014	33.8010 °S; 71.6970 °W	2	4
Maipo-rivier, Tejas Verdes			1997–2014	33.6284 °S; 71.6086 °W	3	4
Tinguiririca-rivier, Palmilla			1997–2014	34.5970 °S; 71.3556 °W	3	4
Universidad de Chile, La Pintana			1997–2014	33.5733 °S; 70.6327 °W	5	4
Frankryk						
Liggings 1–6		FR	Julie 2017	47.3440 °N; 0.7636 °W	8	4,6
				46.9280 °N; 0.3332 °W	10	4
		FR		46.9401 °N; 0.3686 °W	10	4,6
				47.0261 °N; 0.3447 °W	5	4
		FR		47.0328 °N; 0.3474 °W	4	4,6
				47.0407 °N; 0.3339 °W	6	4
Ambillou-Château		FR	Junie 2019	47.2386 °N; 0.3445 °W	9	5,6
Bouillé-Saint-Paul		FR	Junie 2019	47.0273 °N; 0.3443 °W	13	5,6
Brézé		FR	Junie 2019	47.1726 °N; 0.0729 °W	10	5,6
Cersay 1 & 2		FR	Mei 2019	47.0531 °N; 0.3648 °W	11	5,6
			Julie 2019	47.0531 °N; 0.3648 °W	8	5,6

Tabel A.1: Breedvoerige inligting oor die vindoorde op vier kontinente waar *Xenopus laevis*-eksemplare vir parasitologiese opnames versamel is (*vervolg*).

Vindoord	Habitat	Stamlyn	Datum	Koördinate	Monstergrootte	Hoofstuk(ke)
Chalonnes-sur-Loire		FR	Junie 2019	47.3440 °N; 0.7636 °W	6	5,6
Épieds			Junie 2019	47.1413 °N; 0.0606 °W	12	5
La Butte			Mei 2019	46.9185 °N; 0.2803 °W	7	5
Le Coudray-Macouard		FR	Junie 2019	47.1872 °N; 0.1151 °W	11	5,6
Massais		FR	Junie 2019	47.0106 °N; 0.3582 °W	16	5,6
Saint-Martin-de Sanzay		FR	Mei 2019	47.0729 °N; 0.1898 °W	8	5,6
Portugal						
Lage en Barcena-strome, Oeiras			Junie–Augustus 2013	38.7307 °N; 9.3187 °W	80	4
				38.6922 °N; 9.3154 °W		4
				38.7517 °N; 9.2898 °W		4
				38.7460 °N; 9.2869 °W		4
				38.7450 °N; 9.2867 °W		4
				38.7420 °N; 9.2856 °W		4
				38.7439 °N; 9.2874 °W		4
				38.7378 °N; 9.2834 °W		4
				38.7354 °N; 9.2821 °W		4
				38.7091 °N; 9.2731 °W		4
Lissabon		PT	Februarie 2019	38.7136 °N; 9.2897 °W	1	6
Verenigde State						
Dulzura-spruitsisteem, San Diego-distrik, Kalifornië			1999–2001	32.6250 °N; 116.7761 °W	68	4
Rancho Jamul-sisteem, San Diego-distrik, Kalifornië			1999–2001	32.6675 °N; 116.8633 °W	132	4
Santa Ana-rivier, Riverside-distrik, Kalifornië			1999–2001	33.9667 °N, 117.6453 °W	30	4

Bylaag B

Ondersoek oor die intraspesifieke morfometriese variasie van *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) vanuit divergerende gasheerstamlyne in sy natuurlike gebied

B.1 Agtergrond en doel

Intraspesifieke morfologiese variasie is al voorheen in die monogeneër *Protopolystoma xenopodis* (Price, 1943) Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) opgeteken, met die lengte van die genitaalstekels wat merkbaar toeneem van die suidelikste tot die meer noordliggende bevolkings van hierdie parasiet (Tinsley & Jackson, 1998b). Die ruimtelike variasie in ander kenmerke van taksonomiese belang in die genus *Protopolystoma* (volgens Tinsley & Jackson, 1998b), soos aantal laterale en mediale divertikel, postovariële intersekale anastomoses en vrom en grootte van die groot hamuli en eiers, is as onderafdeling van hierdie PhD-projek op 'n klein monster wurms ondersoek. Die doel van hierdie ondersoek was om vas te stel of daar morfologiese verskille tussen *P. xenopodis* vanaf die somer- en winterreënvalstreke wat ooreenstem met die divergerende filogeografie van beide die parasiet en sy gasheer *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (Anura: Pipidae),

bestaan.

B.2 Morphometriek

Permanente preparate is van 13 polistomatiede van die noordoostelike stamlyn van die gasheer (SA5-liggings) en 10 van die suidwestelike stamlyn (SA1-liggings) berei, wat nege vindoorde, naamlik Dullstroom, Modimolle, Potchefstroom, Witrivier (twee vindoorde), Tzaneen, Hermanus en Kaapstad (ttwee vindoorde), verteenwoordig. Polistomatiede wat óf in 10% neutraal gebufferde formalien óf in 70% etanol gepreserveer is, is deur 'n afnemende etanolreeks hidreer tot kraanwater. Die eksemplare is oornag in asetokarmyn gekleur. Daarna is die eksemplare hidreer in 'n toenemende etanolreeks tot absolute etanol, met kleurkorreksies deur soutsuur by te voeg terwyl die eksemplare in die 70% etanol gelê het. Die eksemplare is in xileen verhelder en op 'n mikroskoopskyfie onder 'n dekglasie in kanadabalsem (Sigma-Aldrich Mpy., Steinheim, Duitsland) gemonteer. Die preparate is teen 60℃ vir ongeveer 48 uur gedroog. Gedurende die hele proses is die eksemplare hoegenaamd nie aan lug blootgestel nie om verkleuring te verhoed. Metings en mikrofoto's is op 'n Nikon ECLIPSE E800 saamgestelde mikroskoop saam met die NIS-Elements Documentation *weergawe* 3.22.09-sagteware (Nikon Instruments Geïnk., Tokio, Japan) geneem.

B.3 Statistiese analises

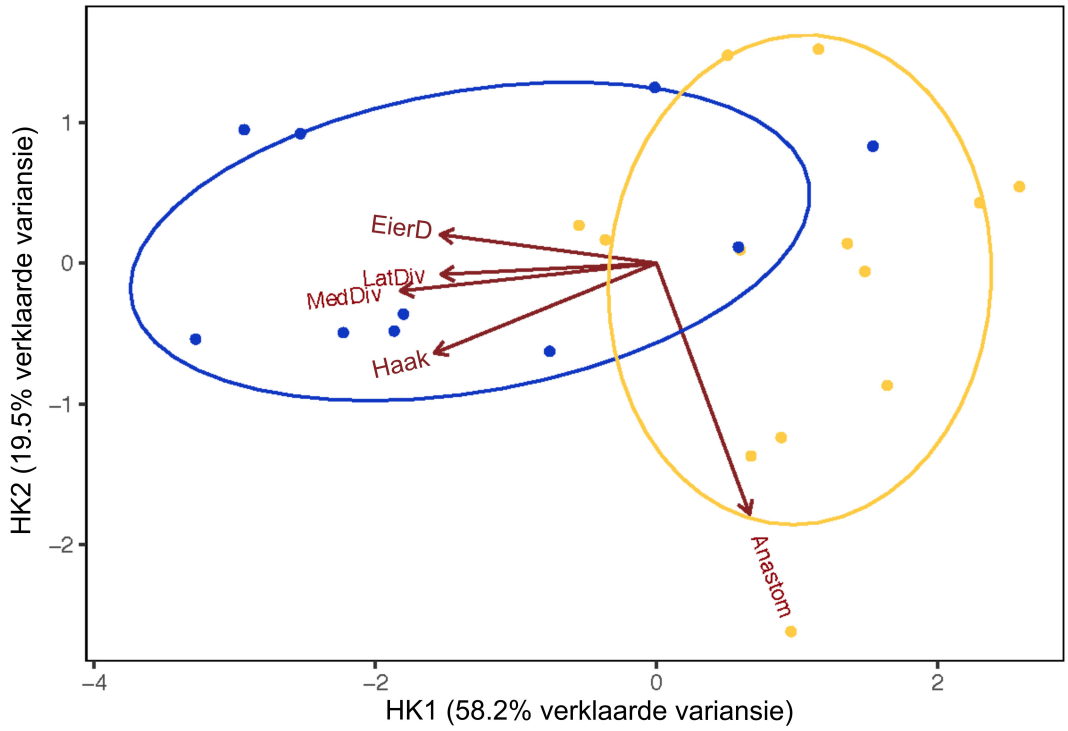
Nadat die metings geneem is, is die 12 eienskappe met nietige ontbrekende datapunte onder die gemete wurms statisties tussen die twee groepe in R *weergawe* 3.5.1 (R Core Team, 2018) vergelyk. Ontbrekende datapunte is deur middel van die stogastiese woudmetode in die R-paket *missForest* (Stekhoven, 2013) geïmputeer. Hierdie metode is verkies omdat dit 'n nieparametriese benadering, wat geskik is vir klein monstergroottes, toepas en omdat dit 'n verskeidenheid van tipes afhanklikes kan hanteer (Stekhoven & Bühlmann, 2012). Omdat sekere eienskappe met parasietouderdom, of liggaamsgrootte, 'n aanduider van ouderdom, kan varieer, is die mediaanliggaamslengte en -breedte en mediaanhaptorlengte en -breedte tussen die twee groepe met die nieparametriese Wilcoxon-Mann-Whitney-toets (WMW) vergelyk voordat ander vergelykings uitgevoer is. Daarna is die Wilcoxon-Mann-Whitney gebruik om te toets of daar beduidende verskille in die mediaanaantal postovariële intersekale anastomoses en laterale en mediale divertikels (gemiddeld van linker- en regterkant) en die mediaanlengte van die terminale haak en die dorsale en vetrale wortels van die groot hamuli (ook die gemiddeld van die linker- en regterkant) en eierlengte en -breedte is tussen die twee groepe van *P. xenopodis*. 'n Hoofkomponentanalise (PCA), wat geredelik in numeriese taksonomie gebruik word,

ook van monogeneërs (Hahn *et al.*, 2011), is uitgevoer om die verwantskappe tussen die polystomatiede van verskillende liggings te evalueer baseer op die variansie in die eienskappe wat beduidende verskille tussen die twee groepe getoon het. Die PCA het veral getoets of die kombinasie van die beduidend verskillende morfologiese eienskappe kon onderskei tussen polistomatiede vanuit gashere van die twee filogeografiese stamlyne sonder om vooraf geografiese oorsprong in ag te neem, ten spyte van oorvleueling in die afmetings van al hierdie eienskappe tussen die twee groepe. Daarbenewens het die voorstelling die eienskappe uitgelig wat die grootste bydrae gemaak het tot die variasie tussen die groepe. Die data is vooraf kolomsgewys gestandaardiseer in die R-paket *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019), soos voorgestel deur Thorpe (1981), omdat Euklidiese afstande in 'n PCA baie gevoelig is vir verskillende meeteenhede. Die PCA self is ook in R uitgeoefen deur gebruik te maak van die singulierewaarde-ontbindingsmetode.

B.4 Beduidende morfologiese variasie tussen Suid-Afrikaanse *Protopolystoma xenopodis*

In hulle herbeskrywing van *P. xenopodis*, meld Tinsley & Jackson (1998b) dat die spesie beduidende, tog aaneenlopende, geografiese variasie in die grootte van die genitaalstekels tussen suidelike en meer noordelike bevolkings van *X. laevis* vertoon. Daarby het hulle sekere sleuteleienskappe wat gebruik kan word om tussen die ses spesies van *Protopolystoma* te onderskei, naamlik variasie in die morfologie van die ingewande, groot hamulus en die genitaalstekels (Tinsley & Jackson, 1998b). Dus is hierdie eienskappe spesifiek gekeur om die geografiese variasie in *P. xenopodis* in suidelike Afrika te ondersoek.

Dit wil voorkom asof algehele liggaamsgrootte, wat die grootte van ander strukture in die liggaam kan beïnvloed, nie beduidend tussen die polystomatiede wat gemeet is van die noordoostelike stamlyn (SA5) of die suidwestelike stamlyn (SA1) verskil nie. Nóg mediaanliggaamslengte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 1854.0 μm, mediaan_{SA5} = 1769.5 μm, p = 0.5224) en -breedte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 712.5 μm, mediaan_{SA5} = 677.0 μm, p = 0.9274), nóg mediaanhaptorlengte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 437.5 μm, mediaan_{SA5} = 387.1 μm, p = 0.1535) en -breedte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 367.0 μm, mediaan_{SA5} = 329.0 μm, p = 0.4458) het beduidend tussen die twee groepe verskil. Omdat liggaamsgrootte nie 'n strengelfaktor is nie, is die beduidende verskille in die aantal postovariële intersekale anastomoses (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 2, mediaan_{SA5} = 2, $p < 0.05$), laterale (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 27, mediaan_{SA5} = 24 μm, $p < 0.05$) en mediale divertikels (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 26 μm, mediaan_{SA5} = 20 μm, $p < 0.05$), terminale haaklengte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 46.8 μm, mediaan_{SA5} = 37.8 μm, $p < 0.05$) en eierlengte (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 237.9 μm, mediaan_{SA5} = 220.8 μm, $p < 0.05$) toegeskryf aan geografiese divergering in morfologie. Drie van die gemete eienskappe, naamlike lengte van die dorsale (WMW-toets, mediaan_{SA1} = 137.5 μm, mediaan_{SA5} = 136.0 μm, p = 1) en



Figuur B.1: Hoofkomponentanalise van die morfologiese eienskappe van *Protopolystoma xenopodis* van twee filogeografiese stamlyne van die gasheer *Xenopus laevis*. Hoofkomponente is vanaf vyf morfometriese veranderlikes, naamlik eierlengte (EierD), aantal laterale (LatDiv) en mediale (MedDiv) divertikels, postovariële intersekale anastomoses (Anastom) en lengte van die terminale haak van die hamuli (Haak) van polistomatiede vanuit die suidwestelike (SA1 in blou) en noordoostelike (SA5 in geel) filogeografiese stamlyne van die gasheer bereken. Ellipse dui die normale kontoerlyn van een standaardafwyking (68%) van die gemiddelde van elke groep.

ventrale wortels van die hamuli (WMW-toets, mediaan$_{SA1}$ = 149.0 μm, mediaan$_{SA5}$ = 135.9 μm, p = 1) en eierdeursnit (WMW-toets, mediaan$_{SA1}$ = 81.8 μm, mediaan$_{SA5}$ = 79.1 μm, p = 0.0880), het nie beduidend tussen die twee groepe verskil nie. Dus, *P. xenopodis* van die suidwestelike dele van die streek het minder variasie in die aantal anastomoses (een of twee in vergelyking met een tot vier) getoon, het meer laterale en mediale divertikels besit en het langer terminale hake op die hamili en langer eiers gead as hulle noordelike eweknieë.

Hierdie tendens is deur die resultate van die PCA beklemtoon, aangesien dit gedeeltelik kon onderskei tussen polistomatiede vanuit die twee gasheerstamlyne gebaseer op die beduidend divergerende morfologiese eienskappe (Figuir B.1). Die eerste twee hoofkomponente het onderskeidelik 58.6% en 19.33% van die waargenome variansie verklaar, wat gesamentlik 77.93% van die verklaarde variansie uitmaak.

B.5 Implikasies

Die resultate het aangedui dat daar beduidende morfologiese variasie tussen die suidelike Afrikaanse stamlyne van *P. xenopodis* bestaan. Dit behels sekere van die eienskappe wat 'n belangrike rol in die uitkenning van spesies in die genus speel, soos die aantal anastomoses en ingewand- en hamulusmorfologie (Tinsley & Jackson, 1998b), wat die belang van hierdie kenmerke as rolspelers in aanvangspesiëring beklemtoom. Daarbenewens was die kenmerke wat beduidend tussen die twee groepe verskil het, óf by voortplanting, óf by voeding, óf by aanhegting betrokke. Aangesien voeding en aanhegting direk aan gasheereienskappe gekoppel kan word (synde die gasheer se blaas beide die aanhegtingsubstraat en die voedingsbron is), mag die waargenome divergering aanpassing tot verskillende stamlyne van die gasheer voorstel. Variasie in eierafmetings, 'n aspek van voortplanting, mag selfs verder 'n meganisme vir voortplantingsisolasie aandui.

Nietemin, voordat ons te veel afleidings maak, moet ons in gedagte hou dat die parasiete wat hier ondersoek is van die twee mees geografies verwyderde stamlyne van die gasheer afkomstig is en dat hierdie stamlyne ook twee uiters uiteenlopende klimaatstreke bewoon. Veelbetekenend is die invloed van die omgewing op eierproduksie in *P. xenopodis* opgeteken (Jackson & Tinsley, 1988). Met die toevoeging van eksemplare van die stamlyne wat geografies gesproke tussen hierdie twee lê, kan ons verwag dat die morfologiese variasie op 'n spektrum vertoon wat nou aansluit by die geografiese afstande tussen die groepe. In werklikheid sinspeel die effense oorvleueling tussen die groepsgemiddelde, soos deur die PCA voorgestel, op kontinue variasie, eerder as divergerende seleksie. Dit sluit aan by die "significant, but continuous" variasie in penisstekels wat in 'n vorige studie (Tinsley & Jackson, 1998b) waargeneem is, ofskoon op 'n groter geografiese skaal.

Op die ou end is hierdie bevindinge nie noodwendig waardevol vir spesie-uitkenning vanuit 'n taksonomiese beskouing nie, soos die geval is vir die girodaktiliedmonogeneërs wat salm en forel parasitiseer nie (Hahn *et al.*, 2011). Wat hierdie bevindinge egter aan die lig bring is 'n moontlike skakel tussen gasheer en parasiet se morfologiese en genetiese variasie. Dienooreenkomstig dui hierdie skakel op 'n moontlikheid van 'n gesamentlike evolusionêre geskiedenis tussen gasheer en parasiet, wat hierdie sisteem die ideale model maak om die prosesse wat nuwe spesies tot gevolg het, uit te pluis.